

RENATA MORISHITA

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE OVÓCITOS E CÉLULAS FOLICULARES NO
OVÁRIO DA ARANHA-MARROM, *Loxosceles intermedia***

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Biologia
Celular, Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cloris Ditzel Faraco

CURITIBA

2003

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia

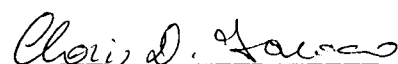
Sector de Ciências Biológicas

Universidade Federal do Paraná

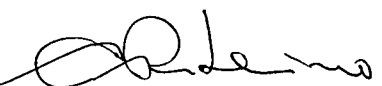
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado “ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE OVÓCITOS E CÉLULAS FOLICULARES NO OVÁRIO DA ARANHA-MARROM, *Loxosceles intermedia*”, de autoria da pós-graduanda Renata Morishita, e com a Banca Examinadora constituída pelos Professores: Dra. Cloris Ditzel Faraco (Orientadora e Presidente, do Departamento de Biologia Celular da UFPR), Dr. Klaus Hartfelder (FFCL-Ribeirão Preto) e Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro (Departamento de Biologia Celular – UFPR). Atribui individualmente as seguintes notas: Dra. Cloris Ditzel Faraco, nota: 10 (dez); Dr. Klaus Hartfelder, nota: 10 (dez) e Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, nota: 10,0 (Dez). De acordo com as exigências do Regulamento do Program de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, a candidata foi: aprovada com a nota: 10,0 (dez), para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 26 de março de 2003.


Dra. Cloris Ditzel Faraco


Dr. Klaus Hartfelder

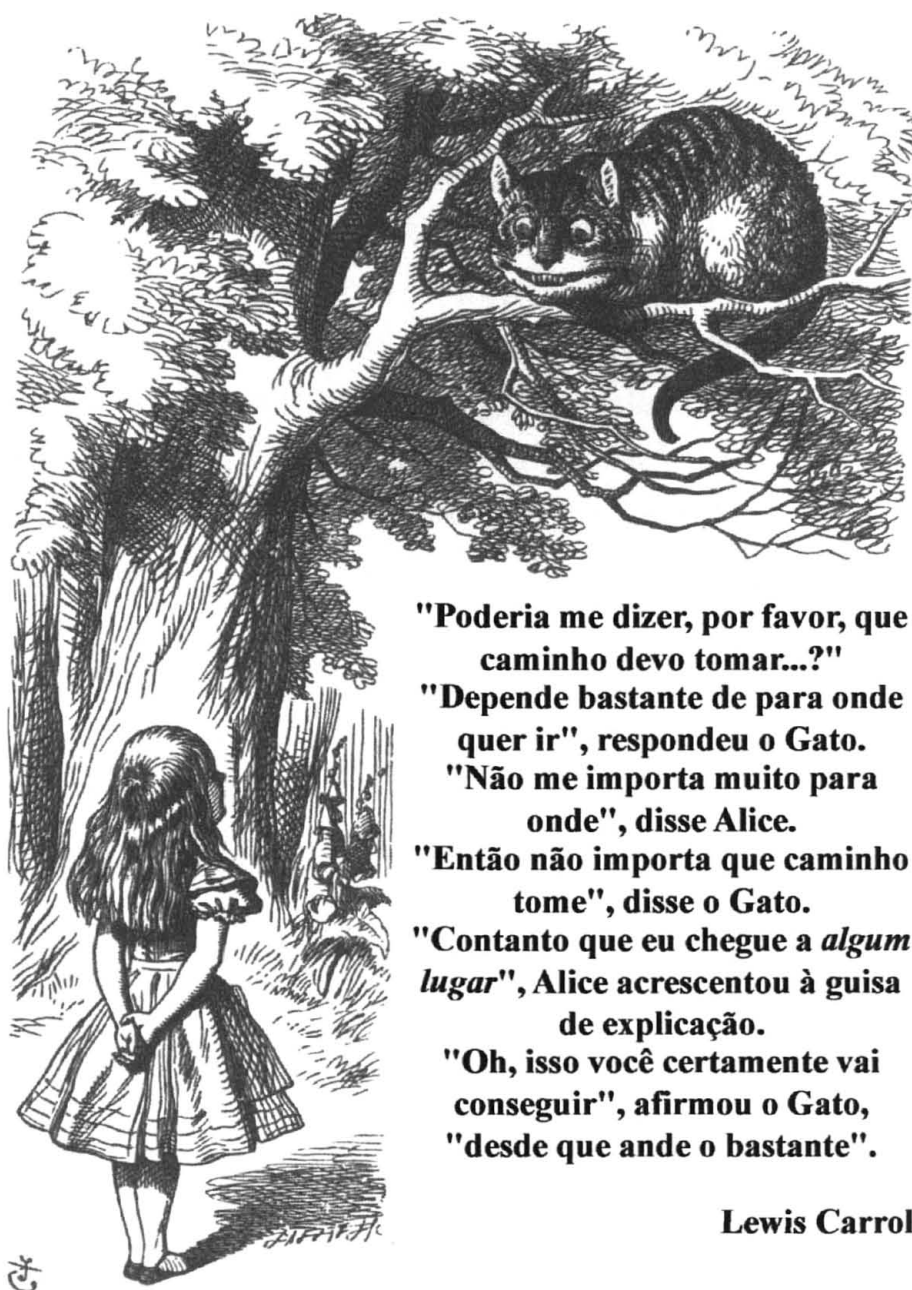

Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

**Dedico este trabalho aos meus pais,
Kazu e Cida,
e às minhas irmãs Fer e Clau**

AGRADECIMENTOS

À minha família, pela compreensão, incentivo e apoio incondicional;
Às amigas: Marcela, Ramoci e Rebeca, pela presença nos momentos mais difíceis;
À Vivian, Márcio e Vinícius, por me deixarem fazer parte desta família maravilhosa;
Às companheiras Fabiana e Simone, por estarem sempre presentes e dispostas a ajudar;
A todos os professores do Programa de Pós Graduação, pela formação e dedicação;
À Coordenação do Programa, representada pelos professores Ciro e Carolina;
Às secretárias Marlene e Gerizalda e demais funcionários;
A todos os colegas do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, pelo apoio e paciência;
A todos os colegas do Mestrado, pela ótima convivência;
Aos professores: Léa, Cecília e Luis Fernando, pela amizade, apoio e pelas indispensáveis aulas de Histologia;
Ao professor Marco Randi, pela paciência e disposição a ajudar;
Ao CNPq, pelas bolsas concedidas na Iniciação Científica e Mestrado;
Em especial meu sincero agradecimento à Professora Cloris, por todas as oportunidades concedidas, pela paciência e dedicação, por me apresentar a Biologia do Desenvolvimento e por me ensinar a trabalhar com humildade e ética.

O desenvolvimento deste trabalho não seria possível sem a colaboração e incentivo destas pessoas que estiveram presentes durante todo este tempo: obrigada!



"Poderia me dizer, por favor, que caminho devo tomar...?"

"Depende bastante de para onde quer ir", respondeu o Gato.

"Não me importa muito para onde", disse Alice.

"Então não importa que caminho tome", disse o Gato.

"Contanto que eu chegue a *algum lugar*", Alice acrescentou à guisa de explicação.

"Oh, isso você certamente vai conseguir", afirmou o Gato, "desde que ande o bastante".

Lewis Carroll

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O OVÁRIO DE EVA.....	2
1.2 A OOGÊNESE.....	3
1.3 A OOGÊNESE EM INVERTEBRADOS.....	4
1.4 O SUCESSO REPRODUTIVO DE <i>Loxosceles intermedia</i> : UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA.....	5
1.5 CARACTERÍSTICAS DO GRUPO.....	6
1.6 INTERAÇÕES CELULARES NO OVÁRIO.....	9
1.7 EVENTOS CRUCIAIS NA OOGÊNESE – A FUNÇÃO DA CADERINA.....	14
1.8 <i>A Drosophila</i> COMO MODELO EXPERIMENTAL PARAFILÉTICO NA OBTENÇÃO DE DADOS PARA O ESTUDO DA ARANHA-MARROM.....	18
1.9 EXEMPLOS EM VERTEBRADOS.....	20
1.10 ADESÕES E JUNÇÕES CELULARES: CADERINA E GAPS.....	22
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 FIXAÇÃO E DISSECÇÃO.....	25
3.2 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ÓPTICA.....	25
3.3 PROCESSAMENTO IMUNOCITOQUÍMICO.....	26
3.4 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO-LOCALIZAÇÃO DE JUNÇÕES CELULARES ATRAVÉS DO TRAÇADOR NITRATO DE LANTÂNIO.....	27
4. RESULTADOS.....	29
4.1 OBSERVAÇÃO MACROSCÓPICA.....	29
4.2 ORGANIZAÇÃO DOS OVÓCITOS NO OVÁRIO-OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA.....	29
4.2.1 Caracterização dos estágios de desenvolvimento dos ovócitos.....	29
4.2.2 Mecanismo de entrada do ovócito no lúmen ovariano.....	31
4.3 INTERAÇÕES CELULARES NO OVÁRIO-OBSERVAÇÃO ULTRAESTRUTURAL.....	31
4.4 INTERAÇÕES CELULARES NO OVÁRIO-OBSERVAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA.....	33
5. FIGURAS.....	35
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÕES.....	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 –	VISTA DORSAL DE <i>L. intermedia</i>	36
FIGURA 02 –	VISTA VENTRAL DE <i>L. intermedia</i>	37
FIGURA 03 –	DETALHE DA ABERTURA GENITAL SIMPLES.....	38
FIGURA 04 –	VISTA DORSAL DO APARELHO REPRODUTOR FEMININO.....	39
FIGURA 05 –	CORTE TRANSVERSAL DO OVÁRIO: OVÓCITOS I.....	40
FIGURA 06 –	CORTE TRANSVERSAL DO OVÁRIO: OVÓCITOS I, II E III.....	41
FIGURA 07 –	CORTE TRANSVERSAL DO OVÁRIO: OVÓCITO III.....	42
FIGURA 08 –	CORTE TRANSVERSAL DO OVÁRIO: OVÓCITO IV.....	43
FIGURA 09 –	CORTE TRANSVERSAL DO OVÁRIO: OVÓCITO V.....	44
FIGURA 10 –	CORTE TRANSVERSAL DO OVÁRIO: LIBERAÇÃO DO OVÓCITO VI.....	45
FIGURA 11 –	CORTE TRANSVERSAL DO OVÁRIO: LÂMINA BASAL E BANDA PROTÉICA REMINESCENTES.....	46
FIGURA 12A -	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO: LÂMINA BASAL E BANDA PROTÉICA.....	47
FIGURA 12B -	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO: DETALHE DAS PROJEÇÕES DA BANDA PROTÉICA.....	47
FIGURA 13A -	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO: INTERFACE OVÓCITO-CÉLULA DO PEDÚNCULO	48
FIGURA 13B -	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO: MICROVILOSIDADES NA INTERFACE OVÓCITO-CÉLULA DO PEDÚNCULO.....	48
FIGURA 14A -	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO: CÉLULAS DO EPITÉLIO OVARIANO.....	49
FIGURA 14B -	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO: JUNÇÃO DO TIPO GAP ENTRE AS CÉLULAS DO EPITÉLIO OVARIANO.....	49

FIGURA 15A -	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO: CÉLULAS DO PEDÚNCULO.....	50
FIGURA 15B -	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO: JUNÇÕES CELULARES NO PEDÚNCULO.....	50
FIGURA 15C -	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO: DETALHE DA JUNÇÃO GAP ENTRE CÉLULAS DO PEDÚNCULO.....	50
FIGURA 16 –	IMUNOCITOQUÍMICA EM OVÁRIO DE <i>L. intermedia</i> : MARCAÇÃO POSITIVA PARA CADERINA NO EPITÉLIO OVARIANO.....	51
FIGURA 17 -	MARCAÇÃO POSITIVA PARA CADERINA NO EPITÉLIO OVARIANO COM PRESENÇA DE OVÓCITO I.....	51
FIGURA 18 -	MARCAÇÃO POSITIVA PARA CADERINA NO EPITÉLIO OVARIANO COM PRESENÇA DE OVÓCITO II.....	52
FIGURA 19 -	MARCAÇÃO POSITIVA PARA CADERINA: DETALHE DO OVÓCITO II.....	53
FIGURA 20 -	MARCAÇÃO POSITIVA PARA CADERINA: OVÓCITOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS.....	54
FIGURA 21 -	MARCAÇÃO POSITIVA PARA CADERINA: OVÓCITO III.....	55
FIGURA 22 -	MARCAÇÃO POSITIVA PARA CADERINA: OVÓCITO V.....	56
FIGURA 23 -	MARCAÇÃO POSITIVA PARA CADERINA: OVÓCITO VI.....	57
FIGURA 24 -	MARCAÇÃO POSITIVA PARA CADERINA: OVÓCITO VI PREPARADO PARA ENTRADA NO LÚMEN OVARIANO.....	58
FIGURA 25 –	MATERIAL CONTROLE: OVÓCITOS I E III, EPITÉLIO OVARIANO E PEDÚNCULO SEM MARCAÇÃO PARA CADERINA.....	59
FIGURA 26 –	MATERIAL CONTROLE: OVÓCITO V, EPITÉLIO OVARIANO E PEDÚNCULO SEM MARCAÇÃO PARA CADERINA.....	60

RESUMO

Loxosceles intermedia é a espécie de aranha-marrom predominante na região metropolitana de Curitiba. Seu veneno tem ação citotóxica e proteolítica, representando o loxoscelismo um problema de saúde pública. Ovários de fêmeas adultas foram examinados em microscopia de luz e eletrônica de transmissão, e a detecção de caderina foi realizada por imunocitoquímica. Ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento foram observados em uma mesma região do epitélio ventral do ovário, envoltos por uma lâmina basal e depois também por uma espessa banda protéica, e conectados à este epitélio por um pedúnculo. Sendo as únicas células em contato com o ovócito, as células do pedúnculo poderiam exercer funções de células foliculares. A adesão celular caracterizada pela presença de caderina foi observada entre células do epitélio ovariano, do pedúnculo e na interface ovócito-pedúnculo. Em análise ultraestrutural junções do tipo gap foram observadas no epitélio ovariano e entre células do pedúnculo. Em toda a extensão da interface entre o ovócito e as células do pedúnculo microvilosidades foram encontradas. Ovócitos maduros foram observados passando pelo epitélio ovariano para serem liberados no lúmen ovariano. As interações celulares no ovário de *L. intermedia* foram estudadas por análise ultraestrutural e imunocitoquímica, e considerações sobre o padrão de diferenciação das células germinativas e sua liberação são o foco deste trabalho.

ABSTRACT

Loxosceles intermedia is the predominant species of spiders in the metropolitan region of Curitiba. Its poison has cytotoxic and proteolytic action, loxoscelism representing a public health problem. Ovaries of mature females were examined by light and electron microscopy, and cadherin detection was made by immunocytochemistry. Oocytes at all stages of development were observed in the same area of the ventral ovarian wall, surrounded by a basement membrane and later on by a proteic band, and supported by a group of pedicular cells, that are suggested to function as follicular cells, being the only ones in contact with the oocyte. Cellular adhesion was characterized by the cadherin immunolabeling in between the epithelial and pedicular cells, and in the oocyte-pedicular cells interface. Ultrastructural analysis showed gap junctions in the ovarian epithelium and between pedicular cells. Along the oocyte-pedicular cells interface microvilli were observed. Mature oocytes were shown to pass through the ovarian epithelial wall, being released in the ovarian lumen. The cellular interactions in the *L. intermedia* ovary were studied at ultrastructural level and by immunocytochemistry, with considerations about the germ cells differentiation and release patterns.

1. INTRODUÇÃO

O crédito para o primeiro relato histórico dedicado à ciência da Embriologia pode ser oferecido a Aristóteles, que, quatro séculos a.C. observava ovos embrionados de galinha; porém, até a Revolução Científica no século XVII não se aceitava que todos os animais se desenvolviam a partir de ovos fertilizados. Em 1651 William Harvey dá início a um dos maiores debates da História da Ciência: o debate sobre reprodução. Em seu livro intitulado *“Exercitationes de Generatione Animalium”* (Sobre a geração de criaturas vivas), postula que “tudo que é vivo vem do ovo”, ou *“EX OVO OMNIA”*.

Passando pelo curso da História, vários embriologistas fizeram parte de discussões acerca da pré-formação vs. epigênese, ovismo vs. espermismo, dentro do contexto histórico em que se discutia a polêmica teoria da geração espontânea e os dogmas da Igreja Católica.

Durante a segunda metade do século XIX a Biologia seria dominada por teorias de hereditariedade que postulavam que entidades morfológicas eram responsáveis em formar um organismo completo, como as gêmulas de Charles Darwin, os pangenes de Hugo de Vries e as unidades fisiológicas de Herbert Spencer (Pinto-Correia, 1999).

O ano de 1894 é a data base para o nascimento da Biologia do Desenvolvimento, fundada pelo biólogo alemão Wilhem Roux e colegas. Nesta época Roux apoiava August Weissmann em sua teoria do germoplasma. Apesar de Weissmann ser considerado por muitos biólogos um novo tipo de pré-formacionista, ele não propunha que partes de um organismo estavam presentes em miniaturas no plasma germinativo, mas sim que o organismo (ou parte dele) estaria representado em **unidades vitais** no plasma germinativo, o qual seria composto por várias destas unidades, que coletivamente possuiriam todos os constituintes primários do indivíduo.

O plasma germinativo poderia ser visto como corpos de complexa constituição, carregando todas as características básicas para a formação de um novo organismo.

Weissmann se destaca também por estabelecer uma distinção radical entre as células germinativas e as células somáticas e, dentro da sua teoria do germoplasma, chegou a afirmar que as células germinativas derivavam diretamente das células germinativas da geração precedente (Gilbert, 1991).

Apesar das diferentes teorias postuladas na época, havia o consenso de que a hereditariedade deveria ser compreendida em torno de tais entidades morfológicas distintas.

1.1 O ovário de Eva

Dentro deste contexto histórico observa-se que o processo da oogênese é tema de debate desde que os humanos observaram animais saindo de ovos. De Aristóteles até aqui, muito se conjecturou. Do início da teoria pré-formista, em meados do século XVII, com afirmações de que toda a raça humana já estaria contida desde o início no ovário de Eva, passando pelo germoplasma e outras entidades morfológicas, chegando a 1878, com a publicação de Alexander Brant – *Über das Ei und seine Bildungsstaette* (Sobre o ovo e seu órgão de desenvolvimento). No início dos anos 80 o estudo em *Drosophila* levaria à formulação da grande questão de como se dá o início da formação dos padrões embrionários. A resposta para as questões sobre o estabelecimento de padrões do embrião levantou novas questões sobre a arquitetura dos ovários e o crescimento dos ovos, uma vez que o processo de diferenciação não pode ser compreendido sem se saber como as células germinativas são geradas e qual o potencial que elas possuem. Antes de qualquer órgão ou tecido se formar, eventos anteriores devem ocorrer, aqueles que dizem às células quem elas são e quais tecidos devem formar (Büning et al, 1994).

1.2 A oogênese

O zigoto herda do gameta feminino não apenas o material genético, mas também seu citoplasma. Este citoplasma materno é responsável por vários estágios de desenvolvimento no início da embriogênese. Desta forma pode-se concluir que a embriogênese se inicia realmente durante a oogênese (Matova e Cooley, 2001).

A polaridade antero-posterior do embrião, larva e adulto de *Drosophila* tem sua origem na polaridade antero-posterior do ovócito. Os genes de efeito materno expressos no ovário produzem mRNAs em diferentes regiões do ovócito. Estes mRNAs são traduzidos em proteínas de regulação transcricional e traducional que se difundem na blastoderme sincicial e ativam a expressão de genes zigóticos. A presença de moléculas de origem materna no ovócito é um dos principais eventos no processo da oogênese, e fator crucial para a padronização do embrião em início de desenvolvimento, ou seja, imprescindível e vital para a formação do organismo em construção.

A oogênese difere da espermatogênese em vários aspectos. Enquanto o gameta formado pela espermatogênese é móvel, e para isso extremamente pequeno, com núcleo extremamente compactado e citoplasma reduzido, o gameta formado por oogênese é imóvel e contém todos os fatores necessários para iniciar e manter o metabolismo e o desenvolvimento, possuindo citoplasma volumoso, caracterizando o maior tipo celular encontrado na natureza. A oogênese, desta forma, constrói não somente um núcleo haplóide, mas também um estoque de enzimas citoplasmáticas, RNAs, organelas e substratos metabólicos (Gilbert, 2000), além da formação de envoltórios e capas recobrando e protegendo a célula germinativa, em uma combinação de ações do ovócito e das células foliculares.

Em invertebrados, durante a oogênese o ovócito é recoberto pelo envoltório vitelínico e córion. Enquanto o envoltório vitelínico é produzido pelo próprio ovócito, o córion aparece como uma deposição protéica variada em estágios mais tardios do desenvolvimento do ovócito. As proteínas que compõem o córion parecem ser

produzidas pelas células foliculares ou como resultado da secreção celular do epitélio ovariano e útero (Viscuso et al, 1997).

1.3 A oogênese em invertebrados

O interesse em ovos e larvas de invertebrados resultou na criação de uma área de estudos denominada ecologia larval, a qual explora os fatores que influenciam a distribuição e abundância das espécies (Young, 1990 apud Eckezbarger, 1994). Antagonicamente, o ovário e os processos de oogênese sempre foram ignorados na discussão da história da evolução dos invertebrados. A falta de estudos nesta área traz prejuízos para a ciência, uma vez que variações observadas em padrões de organização dos ovócitos e acumulação de vitelo parecem estar diretamente relacionados com diferenças interespecíficas no desenvolvimento embrionário e a subsequente biologia larval, além dos padrões de reprodução. O ovário possui papel importante na formação dos ovócitos porque geralmente está envolvido na mediação ou contribuindo diretamente na biossíntese dos materiais presentes no ovócito. O conhecimento das funções do ovário oferece informações primordiais para a história da evolução e pode ser o objetivo central para os pesquisadores elucidarem a variabilidade dos padrões de reprodução em invertebrados. Para compreender as relações entre a organização do ovócito e os padrões da história natural dos invertebrados é essencial entender a morfologia dos ovários e a oogênese, particularmente durante a vitelogênese, quando o vitelo é sintetizado para ser posteriormente utilizado durante a embriogênese. Importante também se faz o estudo da morfologia do ovário e a oogênese do ponto de vista filogenético para melhor entender a evolução do filo estudado e para entender como esta diversidade é relacionada observando-se variações na oviposição e a utilização dos nutrientes (Eckezbarger, 1994).

1.4 O sucesso reprodutivo de *Loxosceles intermedia*: um problema de saúde pública

Segundo a Secretaria Municipal de Saúde (1993), no início dos anos 90 a incidência do gênero *Loxosceles* em Curitiba aumentou exacerbadamente principalmente da espécie *L. intermedia*, causadora do maior número de **acidentes aracnídeos** na cidade. A realização de extensos trabalhos de monitoramento e alerta ao público aumentou o número de notificações nos postos e na Secretaria Municipal de Saúde, o que pode ser levado em consideração quanto ao aumento de casos nos dados estatísticos. Porém, deve-se salientar que a baixa ocorrência de predadores naturais de *L. intermedia* e ainda o **elevado poder adaptativo da espécie** são motivos relevantes para o alto número de acidentes por *L. intermedia* na região metropolitana de Curitiba. A partir destes dados fez-se necessário a criação de uma comissão multidisciplinar para levantar informações relevantes acerca desta espécie. Esta comissão inclui a subcomissão de ciência básica, que, segundo a Secretaria Municipal de Saúde “tem como objetivo estudar a biologia da aranha, incluindo fatores ambientais que interfiram em seu ciclo biológico”, e que é a única subcomissão que não impõe objetivos a curto prazo, já que a pesquisa básica não funciona de maneira imediatista e que os resultados almejados serão obtidos a longo prazo.

Esta afirmativa pode ser corroborada, pois, segundo Van Lenteren (1999), a pesquisa básica em reprodução deve ter prioridade pois este tipo de pesquisa irá quase sempre resultar em aplicações, como experimentado em manejo de pestes agrícolas. A pesquisa básica em reprodução é capaz de achar soluções inesperadas, como programas de manejo de pragas, com redução de aplicações de produtos químicos convencionais através da manutenção da diapausa, controle químico seletivo com reguladores do crescimento em insetos baseados em estudos endocrinológicos, e ainda programas de controle biológico econômicos baseados na diapausa e estudos partenogênicos. Ainda segundo Van Lenteren, quando a pesquisa é principalmente gerada por questões aplicadas, vê-se que geralmente a criatividade é bloqueada e as soluções encontradas são mais demoradas do que quando vistas por um ângulo

puramente científico. A pesquisa fundamental em reprodução pode e irá ajudar a achar soluções sustentáveis para os problemas atuais.

1.5 Características do grupo

Atualmente existem 34.000 espécies de aranhas descritas e agrupadas em aproximadamente 100 famílias. Elas estão distribuídas por todo o mundo, conquistando todos os ambientes, exceto o ar e mar aberto. A Ordem Araneae é usualmente dividida em três sub-ordens, *Mesothelae*, *Mygalomorphae* e *Araneomorphae*, sendo esta uma das várias classificações existentes para o grupo. Dentro da sub-ordem *Araneomorphae* encontram-se 32.000 espécies em 2.700 gêneros, agrupados em 90 famílias, entre elas a família Sicariidae, à qual pertence o gênero *Loxosceles* (Foelix, 1982). Este gênero tem distribuição cosmopolita, com cerca de 30 espécies para a América do Sul, segundo Gertsch (1967).

As aranhas podem ser classificadas pelo seu tamanho, cor, marcas no corpo, assim como a disposição dos olhos e estruturas reprodutivas.

O corpo da aranha é dividido em duas partes distintas, a porção anterior é chamada de prosoma ou cefalotórax e a porção posterior de opistosoma ou abdome. Estas porções são conectadas por um estreito pedúnculo, o pedicelo. As funções do prosoma são principalmente de locomoção, obtenção de alimento e para integração do sistema nervoso, como local do Sistema Nervoso Central. O opistosoma cumpre principalmente funções vegetativas, como digestão, circulação, respiração, excreção, reprodução e produção de seda. O prosoma é coberto por uma placa dorsal e outra ventral, a carapaça e o esterno, respectivamente. O encontro destas duas placas forma o local de conexão para os seis pares de extremidades: um par de quelíceras, um par de pedipalpos e quatro pares de pernas. Nos machos maduros os pedipalpos são modificados em órgãos copulatórios, e esta característica não é encontrada em nenhum outro artrópodo. Em contraste com o prosoma robusto, o abdome é delicado e em forma sacular, possuindo fiandeiras na sua porção posterior (Foelix, 1982).

A espécie de aranha-marrom predominante no município de Curitiba, *Loxosceles intermedia*, pode ser classificada por um conjunto de características, como sua coloração marrom-avermelhada, tamanho médio de 16 mm, poucos pêlos no corpo, pernas longas e finas, seis ocelos noturnos homogêneos em três díades em linha recurva e fenda genital simples, isto é, abertura sem presença de placa esclerotizada sobre os orifícios genitais. Outras características também são utilizadas para classificar esta espécie, como a disposição dos pêlos na região cefálica, forma e sulcos limitantes laterais menos curvos desta região, e relação entre distância dos olhos posteriores à borda lateral e à linha mediana (Mello-Leitão, 1934). Os receptáculos seminais também são utilizados como identificação, segundo Buckup (1980). A morfologia das fiandeiras é utilizada para determinação da filogenia de aranhas haplóginas, que inclui a família *Sicariidae*, sinônimo de família *Loxoscelidae* para Platnick et al (1991).

Estas aranhas têm hábito noturno, comportamento defensivo, fazem teia irregular e desfiada, podem ser encontradas em pedras, folhas caídas e troncos de árvores. Alimentam-se de pequenos insetos, como formigas, pulgas, traças e cupins. Seus predadores naturais são lagartos, lagartixas, sapos e galinhas.

O veneno da aranha-marrom tem ação citotóxica e as principais consequências da picada são: lesão cutânea, que torna-se avermelhada com possível necrose da área, febre, náuseas e dor muscular, podendo atingir um estado mais grave, como insuficiência renal.

As fêmeas possuem um par de ovários alongados, situados na parte ventral do abdome, e possuem estruturas especializadas no armazenamento de esperma, a spermateca ou receptáculo seminal. Depositam os ovos em ootecas de 3mm de diâmetro em lugares escuros e protegidos. Os filhotes emergem em 24-36 dias e abandonam a ooteca. O desenvolvimento é lento, influenciado pela temperatura, umidade e disponibilidade de comida. Alcançam a maturidade aproximadamente em um ano e podem sobreviver por longos períodos sem comida e água (Fischer, 1996).

A morfologia do aparelho reprodutor de *Loxosceles intermedia* é semelhante à de outros gêneros do mesmo Filo, como a do aparelho reprodutor feminino do escorpião *Buthotus judaicus* (Warbug e Rosenberg, 1992) e *Leiurus quinquestriatus* (Warbug et al, 1995). Estas espécies possuem ovócitos presos ao lado ventral do epitélio ovariano por pedúnculos. Ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento aparecem em uma mesma região do ovário, assim como cicatrizes, pedúnculos degenerados após a liberação do ovócito maduro.

Os ovócitos em estágio inicial de desenvolvimento foram observados entre células do epitélio folicular do hemíptero *Rodnius prolixus*. Este epitélio sofre drásticas mudanças morfológicas com o crescimento do ovócito, e os autores sugerem que os ovócitos estão primariamente presentes em um sincício no epitélio ovariano (Huebner e Anderson, 1972).

O ovócito maduro do crustáceo *Argulus japonicus* aparece dentro do lúmen ovariano, já recoberto pelo córion, denominado “egg shell” pelos autores (Ikuta e Makioka, 1997). Porém, o mecanismo de liberação dos ovócitos não foi descrito para nenhuma das espécies aqui citadas.

Valente (1984) discute os possíveis mecanismos de liberação dos ovócitos maduros para o grupo Arachnida. Duas teorias se confrontam, uma defendendo que os ovócitos, que estão voltados para o lado ventral do abdome, são liberados nesta cavidade, ficando livres e, por movimentos contráteis da musculatura abdominal, alcançando a abertura genital. A outra teoria, defendida pela autora, sugere que os ovócitos entram no lúmen ovariano e seguem dentro dos ovidutos alcançando o útero, sendo liberados através das abertura genital, a qual é contínua a este órgão. Porém, os mecanismos para que isto ocorra não foram mencionados.

Poucos estudos podem ser encontrados sobre a biologia e morfologia das aranhas do gênero *Loxosceles*, assim como de suas estruturas reprodutivas. A falta de trabalhos sobre a anatomia e histologia dos órgãos sexuais de *Loxosceles* dificulta a

elucidação de problemas como o grande sucesso reprodutivo da espécie e sua ampla distribuição.

1.6 Interações celulares no ovário

Os eventos que ocorrem durante a oogênese são reflexo da mudança na homeostase de sistemas celulares interrelacionados. Tal interação celular é estreita, uma vez que o desenvolvimento da célula germinativa depende direta ou indiretamente dos recursos disponíveis das células foliculares e/ou nutrízes, ou mesmo de células de outros sistemas. A interação entre ovócitos e células foliculares e nutrízes é bem estabelecida para o grupo *Insecta*, com descrição de três modelos estruturais de ovário: panoístico, politrófico e telotrófico, definidos de acordo com o tipo de interação celular presente (Huebner e Anderson, 1972).

Os folículos ovarianos em desenvolvimento de insetos mostraram ser bons modelos experimentais para elucidar questões básicas da biologia do desenvolvimento. Um dos eventos cruciais no crescimento ovariano é a acumulação de vitelo, que pode ser produzido pelo ovócito ou captado da hemolinfa por endocitose. Apesar destes dois eventos poderem estar casualmente relacionados, é demonstrado que o ovócito em desenvolvimento expressa sua capacitação para vitelogênese em determinados estágios de desenvolvimento. Independente de qual mecanismo é utilizado para iniciar a vitelogênese, é necessário que o ovócito esteja totalmente equipado para a aquisição de vitelo e que possa realizar esta função de forma molecularmente estável. Uma vez que o ovócito é apenas uma célula em uma unidade multicelular, o folículo ovariano, a questão a ser considerada é como a comunicação célula-célula atua para a capacitação do processo vitelogênico (Huebner, 1981).

O desenvolvimento e diferenciação dos ovócitos e sua interação com as células foliculares já é estudado em insetos, mas pouco se sabe sobre a oogênese em aranhas, principalmente o destino dos ovócitos maduros.

Estudos com ovócitos da aranha *Plexippus paykulli* foram realizados, com ênfase no transporte celular, por Osaki (1972). Simultaneamente ao aparecimento do córion foi identificada atividade micropinocítica pronunciada. O oolema do ovócito pré-vitelogênico aparece em íntimo contato com a lâmina basal. O primeiro sinal de especialização morfológica do oolema é a formação de microvilosidades que se projetam para o espaço formado entre o ovócito e a lâmina basal, evidência para a aquisição de corpos vitelínicos por atividade micropinocítica.

Bilinski (1992) realizou estudos com o ovário do *Diplura Catajapys aquilionaris* e descreveu a diferenciação de células germinativas em ovócitos e células nutrízes, sendo que estas sintetizam macromoléculas, principalmente RNA, que são posteriormente transferidas para o ovócito.

A oogênese foi observada ultraestruturalmente em uma espécie de carrapato por Yano (1990), com descrição do desenvolvimento dos ovócitos. Esta fase pode ser caracterizada pela descentralização do núcleo do ovócito, que se move para o córtex celular voltado para a célula folicular adjacente quando em um estágio mais avançado. A formação de um pedúnculo pelas células foliculares foi descrito, além da incorporação de vitelo de fontes endógenas e exógenas através de microvilosidades e formação de pequenas vesículas que unem-se formando material homogêneo no citoplasma do ovócito. A descrição de microvilosidades e intensa atividade de micropinocitose na membrana do ovócito confirma a incorporação exógena de material protéico, e os grânulos eletrondensos acumulados na zona perinuclear presumem a ação endógena de síntese protéica.

A composição dos grânulos de ovos de insetos foi descrita por Law (1990), sendo estes compostos principalmente por proteínas e lipídios. Os lipídios devem participar como fonte de energia e formação de componentes da membrana para o embrião em desenvolvimento, enquanto que a maioria das proteínas serve como fonte de aminoácidos para a construção de novas proteínas no embrião, mas o destino exato e os estágios de utilização destes componentes ainda não estão elucidados. As

principais proteínas descritas nos ovócitos de insetos são vitelogenina, lipoforina, paravitelina, micro-vitelogenina e insetocianina.

Pouco é conhecido sobre o significado das associações célula folicular-ovócito e, particularmente sobre o significado do pareamento heterocelular de junções gap. Entretanto, muitos conceitos têm sido desenvolvidos acerca deste assunto. Células da granulosa podem ser uma fonte de nutrientes liberados por junções gap para o ovócito em crescimento nos folículos ovarianos de mamíferos. Também, células da granulosa podem prover (via junção gap) um inibidor de maturação do ovócito, que funciona para manter parada a meiose em mamíferos e, talvez, em alguns anfíbios (York, 1993).

Desta forma, pode-se inferir uma possível associação funcional entre formação de junção gap heterocelular e os primeiros processos de maturação dos ovócitos, incluindo a competência à maturação. Entretanto, são carentes os estudos morfológicos de associações celulares intrafoliculares em relação à aquisição da competência à maturação pelo ovócito em espécies de invertebrados.

A oogênese foi descrita para a espécie *Tenebrio molitor*, que apresenta nove estágios de desenvolvimento, sendo três estágios vitelogênicos. Os cromossomos dos ovócitos são capazes de sintetizar RNA quando desespiralizados durante o início da pré-vitelogênese e após a formação do cariossoma, que ocorre no estágio 6. As proteínas encontradas nos ovócitos aparecem por duas origens: parte da proteína ooplasmática é formada *in situ*, enquanto outra é derivada da hemolinfa. As proteínas extra-ovarianas chegam ao ovócito via espaços surgidos entre as células foliculares (Ullmann, 1973).

Estes espaços foram identificados em um gênero de peixe, e estruturas como junções do tipo gap foram observadas em pontos de contato entre células foliculares e em associações célula folicular-ovócito. Em geral, antes da ovulação, microvilos dos ovócitos apareceram em contato com células da granulosa, mas durante a vitelogênese tardia os níveis de contatos juncionais decaíram acentuadamente. Porém, altos níveis de associações intercelulares e contatos juncionais gap foram restabelecidos através da

indução da competência maturacional através de hormônios, e estes níveis se mantiveram altos em ovócitos em início de maturação. Estas mudanças parecem se dever principalmente a alterações no tamanho dos microvilos dos ovócitos e superfície de contato com células da granulosa. Uma função destes contatos deve ser a permissão da transferência de sinais de maturação entre células da granulosa e o ovócito durante os estágios iniciais da maturação folicular. No folículo ovariano de vertebrados, conexões citoplasmáticas diretas entre o ovócito e células da granulosa são estabelecidas no início do desenvolvimento do ovócito. Em peixes, anfíbios e mamíferos estas conexões citoplasmáticas se formam em pontos de contato entre microvilos do ovócito e células da granulosa, ou microvilos da célula da granulosa e ovócito, através de junções do tipo nexus e gap (York, 1993).

A comunicação entre células germinativas e somáticas adjacentes regula o destino, manutenção e diferenciação do gameta. Tazuke e colaboradores (2002) estudaram o produto do gene *zero population growth* (zpg) em *Drosophila*, uma proteína envolvida na formação de uma junção do tipo gap específica para a linhagem germinativa. A proteína Zpg é localizada na superfície das células germinativas e em alguns estágios aparece na interface entre o ovócito e células somáticas, e desempenha um papel crucial no início da diferenciação e sobrevivência da célula germinativa. A perda de função deste gene gerou a incapacidade de diferenciação do gameta. Animais mutantes para este gene eram viáveis, porém estéreis e com gônadas diminuídas. Os resultados levantaram a possibilidade de que pequenas moléculas nutrientes e/ou sinalizadoras desempenham papel fundamental na diferenciação e sobrevivência das células germinativas, e que estas moléculas devam ser transmitidas via junções gap. Este tipo de junção também parece ser importante para a manutenção das células tronco germinativas nos nichos, uma vez que estas junções foram identificadas entre as células tronco e as células somáticas da extremidade do germário. Mutantes para *zpg* tiveram perda de células tronco de linhagem germinativa ao longo do período de vida. Além da função de comunicação, a junção gap pode contribuir para a manutenção das células tronco no nicho participando na formação de adesão mecânica, uma vez que

tais junções foram observadas em conjunção com junções aderentes entre as células tronco e células *cap* do nicho.

As células foliculares em insetos desempenham múltiplas funções, incluindo a síntese de moléculas que recobrem o ovo e proteínas que são adquiridas pelo ovócito concomitantemente com a vitelogenina. Estas células provavelmente desempenham tais funções através de junções do tipo gap, mas estudos comprovaram que o incremento ou diminuição de junções do tipo gap na interface ovócito-célula folicular não coincide com as fases da vitelogênese, necessitando-se a investigação de outros tipos de interação celular que possam estar relacionadas com a competência para tais fases (Mazzini, 1985).

A aquisição de proteínas durante a oogênese foi estudada na mariposa *Cecropia*, através de um modelo experimental *in vitro* de ovócitos e células foliculares em sistemas isolados. Os ovócitos isolados adquiriram menor quantidade protéica do que quando no sistema intacto. A observação de que existe a concentração de proteína nos espaços extracelulares de folículos intactos e de que a vitelogenina é seletivamente adquirida deste concentrado por incorporação pinocítica do ovócito sugere que tal pré-concentração nos espaços extracelulares é necessária para o processo de vitelogênese (Anderson, 1971).

Bohrmann (1993) e colaboradores demonstraram a interação entre o ovócito e células somáticas (nutrizes e foliculares) em *Drosophila melanogaster*. Foi investigada a troca intercelular de uma molécula traçadora fluorescente, Lucifer Yellow, injetada a pressão no ovócito do folículo vitelogênico de *Drosophila*. O traçador alcançou a célula nutriz através de pontes citoplasmáticas e, através de junções do tipo gap, nas células foliculares que cobrem o ovócito. É sabido que células foliculares, células nutrizes e ovócitos interagem de várias formas durante a oogênese, isto é, durante o crescimento do folículo, transporte citoplasmático, vitelogênese e formação do córion. Uma vez observado que junções celulares variam na estrutura e tamanho durante os diferentes estágios de desenvolvimento do folículo, pode-se inferir que estes contatos

celulares participam na coordenação de atividades dos três tipos celulares durante a oogênese.

A ocorrência de junções do tipo gap funcionais entre ovócitos e células foliculares circundantes tem sido bem estabelecida através do uso de corantes fluorescentes. Além da existência de junções do tipo gap, estudos de microscopia eletrônica de complexos ovócito-folículo de vários vertebrados tem documentado a presença de uma variedade de estruturas juncionais.

1.7 Eventos cruciais na oogênese – a função da caderina

Junções aderentes célula-célula em camadas epiteliais formam cintos de adesão contínuos (zonas aderentes) ao redor de cada célula contida na camada, localizadas próximas ao ápice de cada célula, logo abaixo das junções tipo compactas. Os cintos de adesão são diretamente justapostos em células epiteliais adjacentes, e nas membranas plasmáticas são unidas por proteínas transmembrana de ligação, as quais são membros de uma grande família de moléculas de adesão célula-célula dependentes de Ca^{+2} chamadas caderinas.

As proteínas de ligação (α - e β -catenina, vinculina, α -actinina e placoglobina) são responsáveis pela ligação dos feixes contráteis à membrana plasmática. Estes feixes são compostos de filamentos de actina e correm paralelos à membrana, e esta ligação ocorre, portanto, via caderinas e proteínas de ligação em uma rede transcelular extensiva. A contração desta rede, que depende de proteínas motoras como a miosina, parece mediar um processo fundamental em morfologia animal – o “desdobramento” das camadas celulares epiteliais em tubos e outras estruturas relacionadas.

Os desmossomos possuem placa citoplasmática densa composta de um complexo de proteínas de ligação intracelular responsáveis pela conexão do citoesqueleto às proteínas de ligação transmembrana, que interagem através de seus domínios extracelulares e unem as membranas plasmáticas adjacentes. Como nos

cintos de adesão, as proteínas de ligação transmembrana pertencem a família das moléculas das caderinas (Alberts, 1996).

O acoplamento celular através das junções tipo fenda parece ser importante durante a embriogênese. Grupos específicos de células do embrião desenvolvem suas identidades distintas e iniciam a diferenciação, normalmente se desligando do tecido ao redor. Enquanto isso, as células dentro de cada grupo permanecem unidas e tendem a comportar-se como um conjunto cooperativo, todas seguindo uma via de desenvolvimento semelhante e de modo coordenado.

É possível que a conexão celular de embriões forneça uma via para sinalização celular de longo alcance dentro do epitélio em desenvolvimento. Diferentes tipos de conexões traduzem diferentes sinais durante o desenvolvimento, uma vez que a adesão celular pode gerar assimetria na superfície celular e eixos de polaridade, e este conjunto cria ambientes diferenciados para a sinalização espacial. Interações entre proteínas receptoras de adesão e seus componentes ligantes extracelulares constituem a sinalização espacial primária que marca sítios de contato na membrana plasmática e serve para distinguir estes de locais de não-contato.

A adesão célula-célula é necessária para restringir a localização de proteínas da membrana basolateral na membrana plasmática. Mesmo na ausência do contato celular com a matriz extracelular, a adesão célula-célula é suficiente para iniciar a segregação tanto de proteínas da membrana apical e basolateral em diferentes domínios de membrana. A adesão célula-célula também inicia a assimetria em proteínas endógenas da membrana plasmática, sendo que a adesão entre duas células em suspensão é suficiente para que uma proteína endógena apical se localize no domínio da superfície livre voltada para o meio de cultura e proteínas basolaterais (como $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase e E-caderina) se localizem na membrana de contato célula-célula.

A adesão mediada por integrinas e caderinas também induz a associação localizada de redes especializadas do citoesqueleto e proteínas de sinalização nas membranas contactantes, o que direciona mudanças locais e globais na organização da

superfície celular. A actina do citoesqueleto é associada tanto com o receptor de adesão da integrina como ao da caderina, e estas interações servem para reforçar a sinalização espacial vinda dos contatos extracelulares através de mecanismos como: 1) associação entre receptores de adesão e citoesqueleto baseado em actina para reforçar contatos célula-célula e célula-matriz; 2) associação localizada do citoesqueleto como arcabouço para recrutamento e ligação de proteínas de sinalização que irão definir diferentes domínios de membrana, 3) associação de estruturas que fisicamente restringem a localização de proteínas apicais e basolaterais recém sintetizadas (Yeaman et al, 1999).

Existem evidências demonstrando que interações entre fatores de crescimento e eventos iniciais de adesão ocorrem em vários níveis para regular respostas celulares. Fenômenos adesivos influenciam a expressão e atividade de fatores de crescimento, e a composição da matriz e a expressão de receptores de adesão de superfície celular, são, em troca, modulados por fatores de crescimento. Assim, o papel da matriz extracelular em governar a diferenciação de tantos tipos celulares é crucial.

A membrana basal é necessária para ativar a expressão de proteínas e o processo de diferenciação celular, associada com a mudança de adesão aos componentes da matriz extracelular. Entretanto, é aparente que outros estímulos externos, como os fatores de crescimento também modulem o crescimento e diferenciação celular em vários tipos celulares. Fenômenos proliferativos e de diferenciação dependem tanto da ligação à molécula da matriz ou a outras células e fatores mitogênicos solúveis e, na presença de vários sinais externos, a decisão última para a célula proliferar ou diferenciar é uma resposta integrada ao meio adesivo e de fatores de crescimento. Existem evidências demonstrando que interações entre fatores de crescimento e eventos iniciais de adesão ocorrem em vários níveis para regular respostas celulares.

Parece evidente que pelo menos algumas células possam regular a atividade adesiva de suas caderinas, apesar de muito pouco ser conhecido sobre a regulação destas moléculas. Tal regulação pode ser importante para os rearranjos celulares que

ocorrem dentro do epitélio quando as camadas celulares alteram sua forma e organização durante o desenvolvimento animal.

A caderina é a principal molécula de adesão célula-célula envolvida no desenvolvimento e manutenção de todos os tecidos sólidos. A regulação de adesão mediada por caderinas e junções aderentes associadas sustentam a dinâmica das interações de adesão entre as células. O nível de expressão da caderina influencia a força de adesão, e o tipo de caderina expressa determina a especificidade das interações celulares e as propriedades das interações. A regulação pós-transcricional da atividade adesiva é responsável pela maioria das mudanças rápidas e dinâmicas nas interações celulares que sustentam a morfogênese dos tecidos e a homeostase. Muitos processos celulares podem afetar a adesão celular e o estado das junções aderentes formadas por caderinas.

Durante certos processos morfogênicos a força da adesão celular pode ser modulada rapidamente em resposta a fatores de crescimento ou outros sinais. A regulação da atividade da caderina em estudos *in vivo* é pouco estudada. A compactação de embriões de ratos para formação de tecidos resulta da rápida ativação de adesão da E-caderina mediada em resposta à sinalização celular. Neste caso, E-caderinas pré-existentes na superfície celular são recrutadas a regiões de contato celular concomitante com a ativação da adesão. Uma forma mais refinada de regulação da caderina na superfície celular ocorre durante a elongação do embrião de *Xenopus* que contribui para os movimentos morfogênicos da gastrulação. Este tipo de morfogênese tecidual, chamada de extensão convergente, resulta de rearranjos locais, que necessitam que as células quebrem e refaçam continuamente contatos adesivos (Gumbiner, 1996, 2000).

As caderinas estão presentes em diversos eventos morfogênicos durante o desenvolvimento, atuando com múltiplas funções. É provável que elas estejam presentes em vários estágios da oogênese, um processo que depende da interação e comunicação entre diferentes sistemas celulares.

Pouca atenção tem sido dada aos contatos ovócitos-célula folicular que parecem ser complexas. O padrão de expressão gênica e seu controle na construção das estruturas de adesão que conectam ovócitos com células foliculares é desconhecida.

1.8 A *Drosophila* como modelo experimental para a obtenção de dados para o estudo da aranha-marrom

O eixo antero-posterior do embrião de *Drosophila* é definido pela localização de determinantes maternos no ovócito. O mRNA do gene *bicoid* é localizado no pólo anterior e traduzido após a fertilização para dar origem a um gradiente de morfógeno que padroniza a formação da cabeça e tórax. Similarmente, o mRNA do gene *oskar* localiza-se no pólo posterior do ovócito, determinando a formação de determinantes posteriorizantes. A polaridade do eixo antero-posterior, desta forma, é determinada pelo correto posicionamento destes dois mRNAs em pólos opostos do ovócito, um processo que depende de várias etapas durante o início da oogênese, a qual constrói a polarização do citoesqueleto do ovócito (Gilbert, 2000).

O embrião de *Drosophila* se desenvolve a partir de um ovo fertilizado que sofre uma série de divisões nucleares rápidas e sincronizadas, formando um sincício. Os primeiros núcleos (de 8 a 10) a serem envolvidos por membrana são aqueles que migraram para o pólo posterior do embrião. A celularização destas células polares depende de um citoplasma especializado, o plasma germinativo, que é confinado no pólo posterior do ovo durante a oogênese. Este plasma germinativo possui determinantes que irão conferir o destino de precursores de linhagem germinativa a estas células. Estas células polares se dividem e o grupo de células germinativas primordiais migra, durante a gastrulação, para a gônada em formação. No organismo adulto, células-tronco de linhagem germinativa são mantidas em nichos no ovário. Estes nichos estão presentes na extremidade de cada ovariolo, e possuem duas ou três células tronco de linhagem germinativa, e sua progênie irá se desenvolver em ovócitos (Williamson e Lehmann, 1996).

Estas células tronco estão em contato com diferentes tipos de células somáticas, as quais expressam genes importantes para a manutenção das células tronco. Song et al (2002) observaram a importância da adesão mediada por caderina na ancoragem das células tronco de linhagem germinativa nos seus nichos. O estudo trouxe um novo modelo para o recrutamento destas células tronco e sua manutenção no nicho, uma vez que a ausência de caderina levou à redução na habilidade deste tipo celular em ser recrutado e assim afetando seu desempenho no papel de célula germinativa.

A oogênese em *Drosophila* se inicia quando este nicho - o cistoblasto de linhagem germinativa - se divide quatro vezes para produzir um cisto de 16 células germinativas que estão conectadas por pontes citoplasmáticas. Duas destas células se tornam pró-ovócitos e entram em meiose. Uma destas células é selecionada para se tornar ovócito, enquanto o outro pró-ovócito reverte para a linhagem de célula nutriz, juntamente com as outras 14 células de linhagem germinativa (Williamson e Lehmann, 1996).

Niewiadowska e colegas (1999) demonstraram em *Drosophila* que a adesão homofílica mediada pela molécula DE-caderina é responsável pelo posicionamento do ovócito no folículo ovariano. Durante a oogênese, DE-caderina é expressa em todas as células germinativas e foliculares. Antes da formação do folículo ovariano, o ovócito acumula maior quantidade de DE-caderina do que as outras células de linhagem germinativa (células nutrizas), as quais estão conectadas ao ovócito por pontes citoplasmáticas, sendo que a maior concentração de DE-caderina no ovócito depende de sua especificação. O ovócito, que inicialmente possui posição variável, sempre assume posição posterior durante a formação do folículo. Nesta fase é observada maior concentração desta molécula nas células foliculares anteriores e posteriores do que nas células laterais do folículo. Entretanto, a maior concentração é encontrada na interface entre o ovócito e as células foliculares posteriores, indicando que a alta taxa de acumulação desta molécula pode mediar a interação entre estes dois tipos celulares. O fenótipo característico de clones que não expressam esta molécula é a localização errante do ovócito, além de apresentarem folículos com maior número de células

germinativas, forma anormal destas células, células nutrízes fusionadas, acumulação ectópica de f-actina e transporte incompleto de substâncias da célula nutriz para o ovócito.

Além do papel desempenhado no posicionamento do ovócito, a adesão mediada por caderina também é crucial para a formação do cisto e para o correto posicionamento dos dois pró-ovócitos, como se supôs através da observação da co-localização de moléculas de caderina nas pontes citoplasmáticas do cisto (González-Reyes e Johnston, 1998).

1.9 Exemplos em vertebrados

A adesão heterotípica mediada por caderina entre ovócito e células foliculares foi observada também na espécie de peixe *Danio rerio* (Cerdá et al, 1999). Moléculas de caderina e moléculas associadas (α e β -catenina, placoglobina) foram identificadas, sendo abundantemente sintetizadas e estocadas durante a oogênese. Localizadas em estruturas juncionais específicas conectando o ovócito com as células foliculares, possivelmente atuam no estabelecimento da arquitetura folicular. A manutenção destas proteínas em ovos não fertilizados sugere uma função adicional, como um *pool* materno, que poderia atuar na formação de junções no início da embriogênese.

No início da vitelogênese, quando os ovócitos projetam microvilosidades em direção à membrana vitelínica, estes formam contatos focais com as células foliculares, e moléculas de α e β -catenina e caderina foram observadas no córtex do ovócito, em estreito contato com o limite ovócito-célula folicular. Em estágio mais avançado da vitelogênese, a caderina foi observada restritamente, em um padrão pontual, refletindo os locais de contato entre os ovócitos e células foliculares. Estes complexos também devem estar associados no ancoramento de feixes de actina do ovócito em desenvolvimento.

Cerdá e colaboradores (1999) citam a hipótese de que o ovócito possa desempenhar funções regulatórias sobre as células foliculares, e que tal idéia poderá ser corroborada quando o padrão inicial de adesão entre células germinativas e somáticas for descrito no início da oogênese, incluindo a investigação na origem das vias de sinalização envolvidas.

As moléculas de adesão da família das caderinas geralmente estão presentes em processos de adesão homofílica entre células do mesmo tipo. A adesão entre o ovócito e células foliculares é diferente deste padrão, porque estes dois tipos celulares têm origens diferentes. O papel da caderina em adesão heterotípica não é comum, mas já foi observado em mamíferos, também mediando a adesão entre células de linhagem germinativa e somática.

Estudando a oogênese em *Xenopus*, Müller e colaboradores (1992) descreveram diferentes padrões de localização de caderina nos vários estágios da oogênese, refletindo assim as diferentes naturezas destes contatos. No início do desenvolvimento, ovócitos e células foliculares estão unidos por extensos contatos, visíveis através da ampla marcação de caderina entre estes tipos celulares. Com o aparecimento da membrana vitelínica, a localização de caderina se reorganiza ao longo da interface ovócito- célula folicular, em um padrão pontual, que pode indicar a penetração de microvilosidades.

Durante a fase de maturação do ovócito de *Xenopus* o padrão de marcação de caderina demonstra que a molécula não está mais presente na membrana externa do ovócito, e a quantidade total de caderina citoplasmática aumenta, provavelmente pelo aumento de síntese e acumulação durante a maturação.

Esta mudança no padrão da localização da caderina é característica da regulação da atividade adesiva desta molécula. Apesar da regulação estar geralmente relacionada com os níveis de expressão gênica, a regulação pós-transcricional é responsável pela maioria das mudanças rápidas e dinâmicas nas interações celulares presentes no desenvolvimento e regulação da homeostase de um tecido (Gumbiner, 2000). Tais

mudanças funcionam como vias de sinalização, como as vias de transdução de sinal intracelular, similares às aquelas vias induzidas por fatores de crescimento e receptores tirosina quinase. Uma possibilidade é a de que moléculas adesivas e fatores de crescimento, através de vias independentes, ativem efetores comuns. Outra possibilidade é a de que componentes chave de ambas as vias estejam relacionados através de interações físicas. A molécula adesiva, entretanto, pode servir unicamente como centro sinalizador em que sinais adesivos e mitogênicos são utilizados nas vias de transdução (Sastry e Horwitz, 1996).

1.10 Adesões e junções celulares: caderina e gaps

Em *Xenopus*, os contatos entre as microvilosidades da célula folicular e a membrana do ovócito são do tipo gap, e a presença de caderina em células adjacentes pode ser a pré-condição para a formação de junções do tipo gap (Müller et al, 1992; Matsuzaki et al, 1990). Desta forma, a caderina pode, neste modelo, possuir esta função na formação de junções entre células foliculares e ovócitos. A adesão e comunicação intercelular são componentes essenciais no processo de diferenciação e sinalização celular. Estudos em fibroblastos humanos demonstraram que existe uma relação temporal, sendo que a adesão intercelular é um pré-requisito para formação de junções gap. A adesão celular permite o contato consolidado entre células adjacentes, o que facilita a posterior interação célula-célula (Ko et al, 2000). Estudos similares realizados em células de rato em cultivo revelaram que tipos específicos de caderina podem alterar a especificidade das junções gap. Em cultivo em que as células expressavam P-caderina não houve alteração no padrão de formação das junções gap, mas quando as células foram modificadas geneticamente para expressar E-caderina, foi observado um aumento das junções gap na potência de 10 (Prowse et al, 1997).

Importantes funções das junções comunicantes e suas moléculas constituintes recentemente foram demonstradas durante a embriogênese e morfogênese tecidual. Durante a oogênese dos vertebrados, as células germinativas e células somáticas

associadas permanecem conectadas por uma variedade de complexos juncionais e de adesão. Entretanto, a natureza e função destas estruturas de adesão e junção celulares em folículos ovarianos de invertebrados ainda não estão claras. A pesquisa sobre os padrões de formação de adesão e comunicação entre células germinativas e somáticas durante o início da oogênese, incluindo a investigação da origem das vias de sinalização envolvidas possui considerável interesse. A falta de registros de estudos sobre o desenvolvimento de *L. intermedia* não permite especulações sobre seu sucesso reprodutivo e aumento populacional exacerbado na região metropolitana de Curitiba. A partir de dados morfológicos do sistema reprodutor, estudo da biologia celular e molecular dos distintos aspectos da oogênese nesta espécie, poderá ser definido um padrão, talvez ainda não descrito, da produção de células germinativas, uma vez que o grupo não possui quantidade relevante de estudos. Apesar da semelhança em vários aspectos da oogênese com grupos parafiléticos, peculiaridades existem neste grupo que justificam um estudo mais aprofundado.

2. OBJETIVOS

Caracterizar as junções celulares no ovário de *Loxosceles intermedia* por análise ultraestrutural e imunocitoquímica, analisar possíveis interações entre ovócitos e células foliculares, determinar um possível padrão de diferenciação de células do tecido epitelial em ovócito e delimitar possíveis estágios de amadurecimento do ovócito

3. MATERIAL E MÉTODOS

As aranhas da espécie *Loxosceles intermedia* MELLO – LEITÃO, 1934 (Araneae: Sicariidae) foram coletadas na região metropolitana de Curitiba e identificadas de acordo com dados obtidos na bibliografia (Gertsch, 1967), sendo mantidas em frascos plásticos e recebendo água e alimentação regularmente, com fotoperíodo natural.

3.1 Fixação e dissecação

Aranhas fêmeas da espécie *L. intermedia* foram anestesiadas com éter sulfúrico e em seguida fixadas através de injeção de paraformaldeído 1% tamponado em fosfato 0,1M pH 7,4 na região ventral posterior do abdome. O material permaneceu em solução de fixador por uma hora em temperatura ambiente ou, alternativamente, foi fixado fisicamente em microondas. O aparelho de microondas convencional foi previamente aquecido por 6 segundos contendo um becker com água destilada (o qual é substituído a cada aquecimento). Após o pré-aquecimento a calibração foi realizada através de cápsulas de ágar imersas em solução de fixador, com potência de 600 watts, operando em frequência de 2450 Hz. O tempo de exposição foi estipulado com o parâmetro de mudança de coloração da cápsula de ágar, de roxo para azul. O material imerso em solução de fixador foi exposto, em potência máxima, ao tempo referido na calibração (Jamur et al, 1995).

O material fixado foi então lavado em solução tamponada de fosfato 0,1M pH 7,4 e levado ao microscópio estereoscópico. A dissecação foi realizada a partir de um corte na face dorsal do abdome, com retirada do hepatopâncreas para perfeita visualização e coleta dos ovários na face ventral do abdome.

3.2 Processamento para microscopia óptica

Os ovários coletados foram desidratados em série crescente de álcool etílico, com trocas de 10 minutos cada em uma bateria de álcool etílico 50%, 70%, 80%, 90%,

95% e três trocas de 10 minutos cada em álcool etílico 100%. O material foi infiltrado em solução de Histoiresina JB-4 (Polysciences) e álcool etílico 100%, na proporção 1:1 por uma hora, e em solução de Histoiresina 100% *overnight*. A inclusão foi realizada em moldes plásticos a 4°C. Os blocos foram montados em suportes de madeira, trimados e cortados no micrótomo com cortes de 2 a 3µm de espessura, colocados sobre lâminas limpas e secas com poços de água destilada em placa aquecida. Para observação da morfologia, os cortes foram corados com azul de toluidina ou Hematoxilina-eosina, montados em Permount (Sigma), com observação e registro fotográfico em fotomicroscópio óptico Axiophot - Zeiss.

3.3 Processamento imunocitoquímico

Ovários coletados e fixados como descrito acima sofreram três lavagens em solução detergente TTBS (Tris pH 7,5 100mM; NaCl 150mM e Tween 20 0,1% em água destilada), com tempos de 30', 60', e 90', respectivamente. Em seguida foram lavados duas vezes em solução detergente TTBST (saponina 0,02% em TTBS), durante 30' cada lavagem. O bloqueio da ação da peroxidase endógena ocorreu através de uma lavagem de 30' em H₂O₂ 0,3% em TTBST. Para bloquear sítios inespecíficos, foi realizada uma lavagem de uma hora em solução de soroalbumina bovina (BSA- Sigma) 1% em TTBST e duas lavagens de uma hora cada em solução de soro de cabra (GibcoBBL) 10% e BSA 0,1% em TTBST. O anticorpo primário anti - pan caderina (IgG desenvolvido em coelho – Sigma) foi diluído na solução de soro de cabra e BSA na proporção de 1:1000, e o material foi incubado nesta solução a 4°C *overnight*. O material controle permaneceu na solução de soro de cabra e BSA, na ausência do anticorpo 1°. As lavagens descritas acima foram repetidas após a incubação do anticorpo 1°, e o material foi incubado em anticorpo secundário (IgG desenvolvido em burro anti-coelho conjugado à peroxidase – Chemicon) diluído na solução de soro de cabra e BSA na proporção de 1:500, nas mesmas condições. Após a incubação *overnight* no anticorpo 2°, os ovários foram lavados 3 vezes em TTBST e em seguida em TTBS, em lavagens de 30', 60', 90', 90'. Para a revelação da

peroxidase, o material foi imerso em uma solução de H_2O_2 0,01% e 3, 3' - diaminobenzedina (DAB - Sigma) 1% em TTBS. A reação ocorreu no escuro, em aproximadamente 15 minutos. Com a detecção da coloração marrom no material, este foi lavado em TTBS e levado ao processamento de rotina para inclusão em Historesina. Cortes de 7 μ m foram corados com Hematoxilina-eosina e as lâminas foram montadas em Permout para subsequente observação e registro fotográfico.

3.4 Processamento para microscopia eletrônica de transmissão – localização de junções celulares através do traçador nitrato de lantânio

Fêmeas adultas de *Loxosceles intermedia* foram anestesiadas em éter sulfúrico e fixadas através de injeção de solução de paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2% e nitrato de lantânio 1% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,4. Após a dissecação da aranha, os ovários coletados permaneceram em solução fixadora por 2 horas em temperatura ambiente, sendo então lavados em solução de nitrato de lantânio 1% em tampão cacodilato por uma hora. O material foi então pós-fixado por uma hora em solução de tetróxido de ósmio 1% e nitrato de lantânio 1% em tampão cacodilato. Após a impregnação do ósmio, o material foi lavado em tampão cacodilato e processado para microscopia eletrônica de transmissão. A desidratação do material foi realizada em série crescente de álcool etílico, em uma bateria de álcool 15%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%, com tempo de 10 minutos em cada, e três vezes de 15 minutos em álcool 100%. O material foi rapidamente processado em óxido de propileno (2 trocas de 10 minutos) para facilitar a infiltração da resina Spurr (Electron Microscopy Sciences), sendo esta realizada com solução de Spurr/óxido de propileno na proporção 1:1 por uma hora. O material foi então imerso em Spurr 100% e a embebição ocorreu aproximadamente em 4 horas. O material foi colocado em moldes plásticos com resina nova, colocado no vácuo por uma hora e a polimerização ocorreu em estufa a 60°C, por no mínimo 8 horas.

Os blocos foram trimados e cortados no ultramicrotomo, sendo cortes semifinos realizados em navalha de vidro e corados com azul de toluidina. Através da análise

destes cortes em microscópio óptico foi delimitada a área do material a ser observada ultraestruturalmente. Após a trimagem desta área foram obtidos cortes ultrafinos cortados em navalha de diamante, os quais foram contrastados com uranila aquosa 5% e citrato de chumbo e observados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão JEOL - JEM 1200 EXII.

4. RESULTADOS

4.1 Observação Macroscópica

Em observação macroscópica, a fêmea de *Loxosceles intermedia* apresenta abdome arredondado, poucos pêlos no corpo e pedipalpos simples (FIGURA 01). Em vista ventral, é possível observar uma abertura genital simples entre os pulmões (FIGURA 02). Observando em detalhe a abertura genital vê-se que é uma estrutura não esclerotizada que possui um par de receptáculos seminais (FIGURA 03).

Após a dissecação através da face dorsal do abdome, retirou-se o hepatopâncreas e foi possível observar um par de ovários na região ventral do abdome, logo acima das glândulas de seda. Os ovários apresentam ovócitos presos à face ventral do seu epitélio. Ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento puderam ser observados em uma mesma área (FIGURA 04).

A região mais anterior dos ovários não apresenta ovócitos presos, caracterizando os ovidutos, canais contínuos a estes órgãos, que se unem na porção anterior do abdome para formar o útero, órgão ímpar que se abre na abertura genital (FIGURA 04).

4.2 Organização dos ovócitos no ovário - Observação microscópica

4.2.1 Caracterização dos estágios de desenvolvimento dos ovócitos

Os ovários coletados foram processados para microscopia de luz, sendo incluídos em Histoiresina. Cortes transversais destes órgãos corados com azul de toluidina ou hematoxilina-eosina mostram o epitélio ovariano como uma camada celular simples, com polaridade dorso-ventral. No lado dorsal as células, todas com as mesmas características morfológicas, estão arranjadas em uma monocamada, e se

apresentam em contato com o hepatopâncreas (FIGURA 05). Entre as células do lado ventral, em certas regiões, uma célula maior, esférica, com um núcleo proeminente e nucléolo evidente pode ser observada. Percorrendo a extensão da parede ventral é possível identificar várias destas células, os ovócitos em início de desenvolvimento, entre ovócitos mais desenvolvidos, caracterizando os diferentes estágios de desenvolvimento da célula germinativa.

Inicialmente o ovócito possui quase o mesmo tamanho das células do epitélio ovariano, diferindo apenas na morfologia do núcleo e volume citoplasmático ligeiramente aumentado, caracterizando o **ovócito imaturo**, classificado aqui em **estágio I** (FIGURA 05). Tal aumento é contínuo, e ovócitos com maior conteúdo citoplasmático puderam ser observados, protraindo do epitélio ovariano. Ovócitos com esta característica morfológica foram denominados **ovócitos em estágio II** (FIGURA 06). O acúmulo citoplasmático prossegue e os ovócitos, agora denominados **ovócitos em estágio III**, aparecem muitas vezes maiores do que as células do epitélio, com citoplasma homogêneo e presos a este epitélio por um pedúnculo (FIGURA 07). Células diferenciadas do epitélio ovariano próximas ao ovócito parecem formar esta estrutura. A lâmina basal do epitélio continua-se sobre o ovócito, envolvendo-o. Por todo o perímetro do ovócito, entre esta lâmina basal e o envoltório vitelínico, é possível observar uma banda protéica espessa, sendo seu limite visível em ovócitos do tipo III, ao nível das células do pedúnculo adjacentes, com as quais forma uma prega (FIGURA 07). O início de inclusão citoplasmática aparece como pequenos grânulos dispersos no citoplasma, caracterizando **ovócitos em estágio IV** (FIGURA 08).

O ovócito em **estágio V** é caracterizado pela visualização do resultado da vitelogênese, e apresenta grânulos de diferentes tamanhos e composição no citoplasma. O espaço entre a banda protéica e o ovócito maduro aumenta, e é possível delimitar o envoltório vitelínico (FIGURA 09). As células do pedúnculo imediatamente em contato com o ovócito maduro, prestes a ser liberado, classificado como em **estágio VI**, aparecem morfológicamente distintas, sendo que as duas células em contato com o ovócito aparecem alongadas (FIGURA 23). Estas duas células irão

se afastar (FIGURA 24), formando uma abertura que será utilizada para a liberação do ovócito maduro para dentro do lúmen ovariano.

4.2.2 Mecanismo de entrada do ovócito no lúmen ovariano

Para que os ovócitos possam entrar no lúmen ovariano, seus grânulos sofrem um drástico rearranjo, e o ovócito modifica completamente sua morfologia e arquitetura celular, assim como o epitélio ovariano. Para que o ovócito VI, agora muitas vezes maior do que os ovócitos I e II, caiba no estreito lúmen ovariano, seu epitélio alarga-se, aumentando a área disponível para a entrada do ovócito.

O ovócito agora dentro do lúmen ovariano é recoberto somente pelo envoltório vitelínico, e a porção internalizada aparece com grânulos menores do que aqueles presentes na porção do ovócito que ainda está no lado externo do lúmen (FIGURAS 10A e 10B).

Após a liberação do ovócito maduro para dentro do lúmen ovariano, observa-se a lâmina basal e a banda protéica remanescentes no epitélio ovariano. As células do pedúnculo que se rearranjaram para a liberação do ovócito aparecem agora soltas, juntamente com a lâmina basal e a banda protéica. Na mesma área pode-se observar um ovócito em estágio III, caracterizando o processo contínuo da oogênese (FIGURA 11).

4.3 Interações celulares no ovário - Observação ultraestrutural

O lantânio é um metal raro, branco e maleável, possuindo o cátion trivalente La^{3+} energia de movimentação de elétrons suficientemente alta para produzir contraste em imagens de microscopia eletrônica. Quando tecidos são tratados com La^{3+} durante a fixação e/ou durante as lavagens em tampão, o espaço extracelular torna-se

preenchido com um precipitado eletrôn opaco, podendo ser utilizado como um traçador para delinear espaços extracelulares e estruturas de junção intercelular.

Através da utilização do traçador nitrato de lantânio, foi possível observar os espaços intercelulares e junções de membrana na área do pedúnculo e do epitélio ovariano. Usando-se microscopia eletrônica de transmissão é possível analisar a interface entre o ovócito e células do pedúnculo.

O ovócito aparece com grânulos de vitelo e lipídios com diferentes eletrondensidades no citoplasma, sendo recoberto pela membrana vitelínica e uma espessa banda protéica. A lâmina basal recobre estas estruturas (FIGURA 12A). Em maior aumento, é possível observar os detalhes do término desta banda protéica na área de contato do ovócito com a célula do pedúnculo mais periférica, formando uma prega. Tal prega forma interdigitações com a membrana desta célula. Na mesma área pode-se caracterizar microvilosidades e vesículas de micropinocitose entre o ovócito e a célula do pedúnculo (FIGURAS 12B, 13A e 13B).

As células do epitélio ovariano são encontradas justapostas umas as outras, e entre elas foram observados espaços intercelulares, que aparecem como linhas eletrondensas. Através da identificação destes espaços entre as unidades de membrana com depósito de lantânio as junções intercelulares aparecem como regiões de contato da membrana, onde o nitrato de lantânio não se depositou (FIGURAS 14A e 14B). Estas mesmas estruturas estão presentes também entre as células do pedúnculo, e podem ser caracterizadas morfológicamente como junções do tipo gap (FIGURAS 15A, B e C). Estas junções aparecem como um estreitamento das unidades de membrana, com pouca deposição de lantânio. Em maior aumento, partículas intramembranas são observadas nestas junções, padrão característico para esta estrutura (FIGURA 15C).

4.4 Interações celulares no ovário - Observação imunocitoquímica

As caderinas são membros de uma família multigene de receptores glicoprotéicos de cadeia simples, mediando adesão célula-célula dependente de Ca^{2+} , estando também envolvidas em arranjo celular seletivo, resposta mecânica citoplasmática, processos morfogênicos e sinalização intercelular.

Ovários tratados com o anticorpo anti pan-caderina mostram marcações em regiões específicas.

No epitélio ovariano a marcação positiva aparece apenas na face ventral da parede, em pequenas regiões isoladas, formadas por um pequeno número de células, todas morfológicamente epiteliais (FIGURA 16). No mesmo órgão, em outras regiões, é possível observar este padrão de marcação, mas agora com uma das células já mostrando características de **ovócito do tipo I** (FIGURA 17).

Ovócitos do tipo II aparecem protaindo do epitélio, e a marcação positiva para a caderina aparece em todo seu contorno e em seu citoplasma, assim como nas células epiteliais adjacentes (FIGURA 18). Em um estágio mais avançado, este ovócito, que ainda não apresenta um pedúnculo totalmente formado, apresenta marcação pontual ao redor do núcleo pronunciado. As células do epitélio próximas a ele também estão marcadas, e as células do epitélio da face oposta não apresentam marcação (FIGURA 19).

Em uma mesma área do ovário pode-se observar ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento. Ovócitos imaturos ainda embebidos na parede apresentam marcação positiva em todo seu perímetro, assim como as células epiteliais adjacentes, e **ovócitos do tipo III** aparecem com marcação pontual dispersa no citoplasma e uma linha contínua em seu perímetro, enquanto as células do pedúnculo mostram-se fortemente marcadas (FIGURAS 20 e 21).

Quando os ovócitos atingem o **estágio V**, a marcação positiva no seu citoplasma e nas células do pedúnculo é pontual (FIGURA 22). O pedúnculo do

ovócito em estágio VI modifica sua morfologia, e as duas células mais próximas a este ovócito apresentam marcação positiva apenas na região de contato entre elas (FIGURA 23). Quando estas células se afastam para a liberação deste ovócito, não há marcação positiva em nenhuma área do pedúnculo ou do ovócito (FIGURA 24).

O material controle, tratado na ausência do anticorpo 1º, não apresentou nenhum traço de marcação, seja na parede ovariana, em ovócitos imaturos, maduros ou nas células do pedúnculo (FIGURAS 25 e 26).

5. FIGURAS

FIGURA 01: Vista dorsal de *Loxosceles intermedia* fêmea, que apresenta abdome arredondado (→) e pedipalpos simpes (P). Barra: 180µm.



FIGURA 02: Vista ventral. No abdome, a abertura genital (►) encontra-se entre os pulmões (→).
Barra: 180µm.



FIGURA 03: Detalhe da abertura genital simples (→). Observar no lado em que os pêlos foram retirados um dos receptáculos seminais (e). Barra: 55μm.

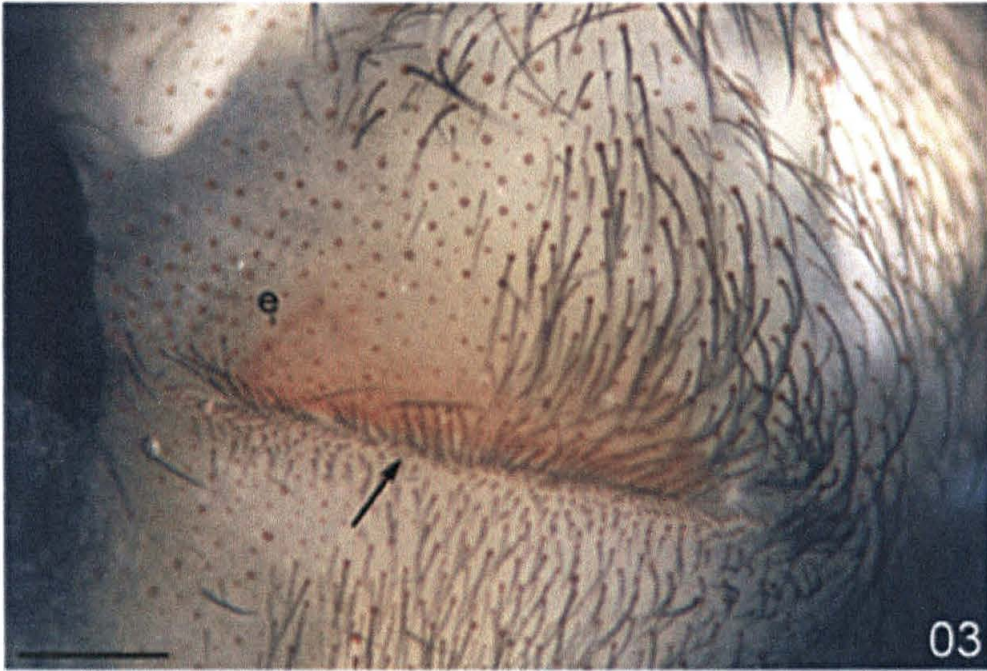


FIGURA 04: No abdome dissecado, em vista dorsal, um par de ovários é observado com ovócitos (O) presos ao lado ventral do epitélio ovariano. Os ovidutos (V) se unem na região anterior do abdome para formar o útero (U), que se abre na abertura genital. Barra: 110µm.

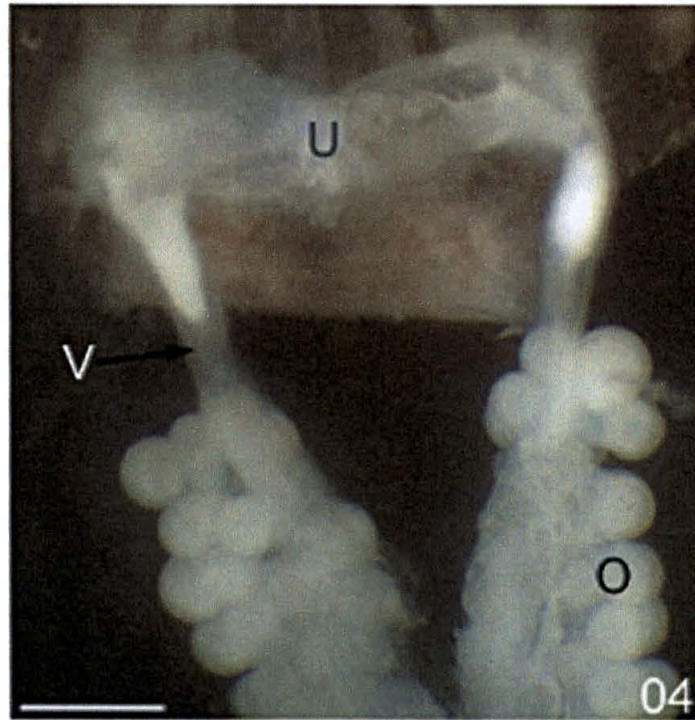


FIGURA 05: Corte transversal do ovário corado em hematoxilina-eosina (HE). A parede dorsal do epitélio ovariano (E) encontra-se justaposta ao hepatopâncreas (H). Entre as células da parede ventral são observados ovócitos em estágio I, com núcleo evidente e sem inclusões citoplasmáticas (→). Na mesma área encontra-se um ovócito com citoplasma homogêneo, caracterizado em estágio III. Barra: 45µm.

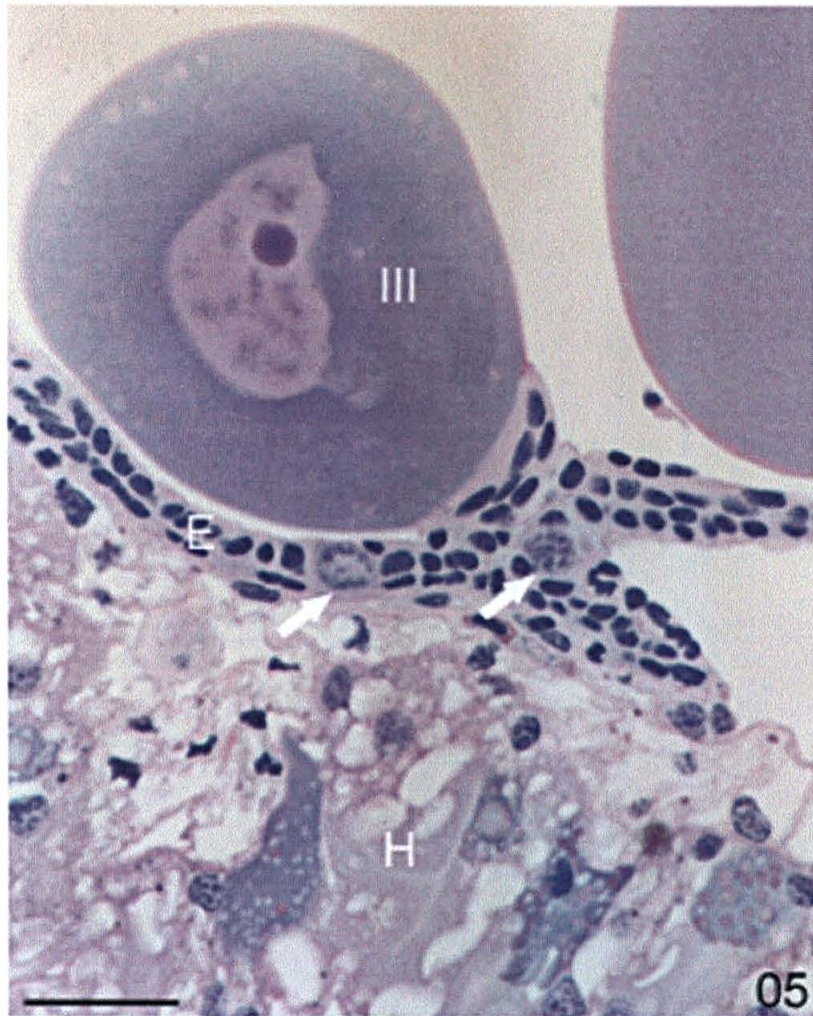


FIGURA 06: Ovócitos em estágio I (▶) e II são observados entre as células do epitélio ovariano. Os ovócitos do tipo I apresentam-se contínuos ao epitélio, e os ovócitos do tipo II, com aumento do volume citoplasmático, já se destacaram deste epitélio. Ovócitos em estágio III estão presentes na mesma área. Coloração: HE. Barra: 45µm.

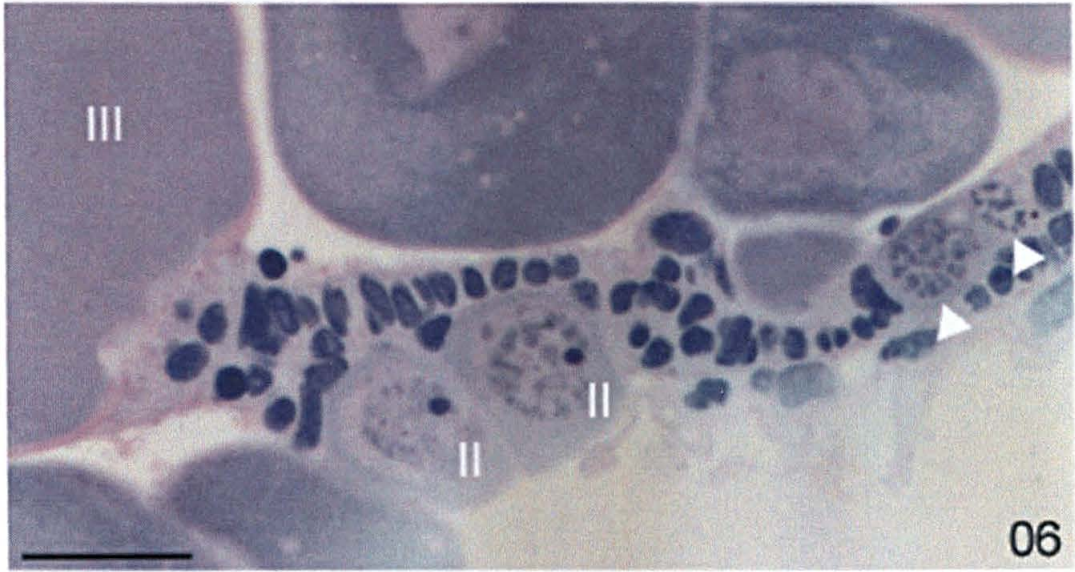


FIGURA 07: O ovócito em estágio III caracteriza-se pelo citoplasma homogêneo, e é preso ao epitélio ovariano por um pedúnculo (P). Esta estrutura é formada por células do epitélio vizinhas ao ovócitos que se rearranjam para sustentá-lo. A lâmina basal e a banda protéica recobrem o ovócito. A banda protéica forma uma prega na região de contato com as células do pedúnculo mais próximas ao ovócito (►).Objetiva: Coloração: HE. Barra: 45µm.

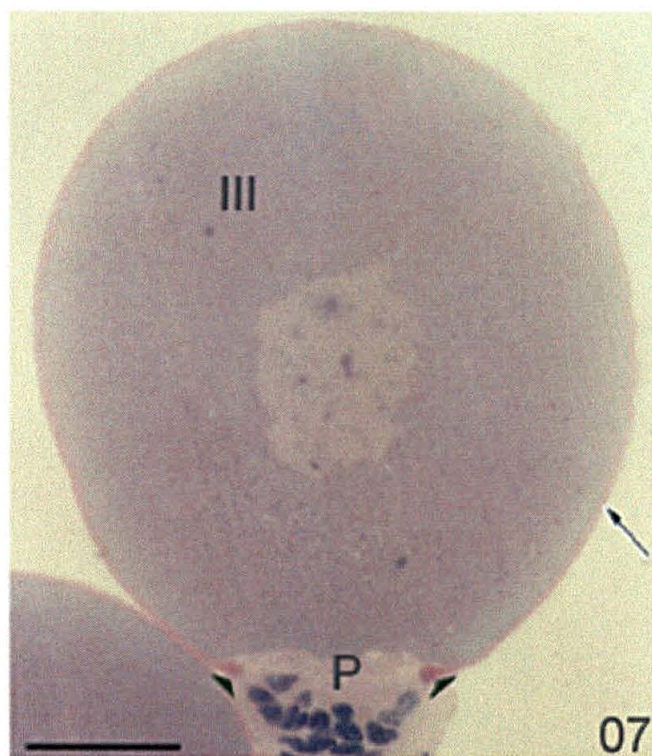


FIGURA 08: O ovócito em estágio IV caracteriza-se pelo início da inclusão citoplasmática. Pequenos grânulos são observados dispersos no citoplasma (→). A lâmina basal é contínua ao ovócito e epitélio ovariano enquanto a banda protéica termina na área de contato do ovócito ao pedúnculo (►). Pedúnculo (P). Coloração: azul de toluidina.. Barra: 45µm.

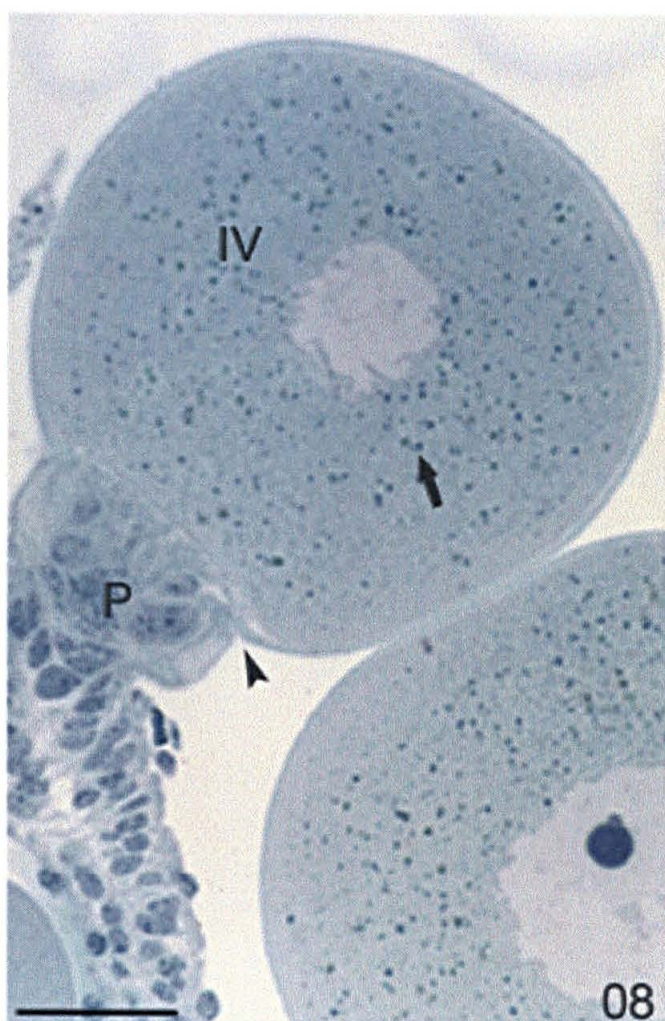


FIGURA 09: O ovócito em estágio V caracteriza-se pelo início de acúmulo de vitelo no citoplasma, que aparecem em grânulos de diferentes tamanhos e densidade. Este ovócito é envolvido por uma membrana vitelínica (►) e mais externamente por uma lâmina basal (C). O ovócito é preso ao epitélio ovariano por um pedúnculo (P). Coloração: HE. Barra: 45µm.

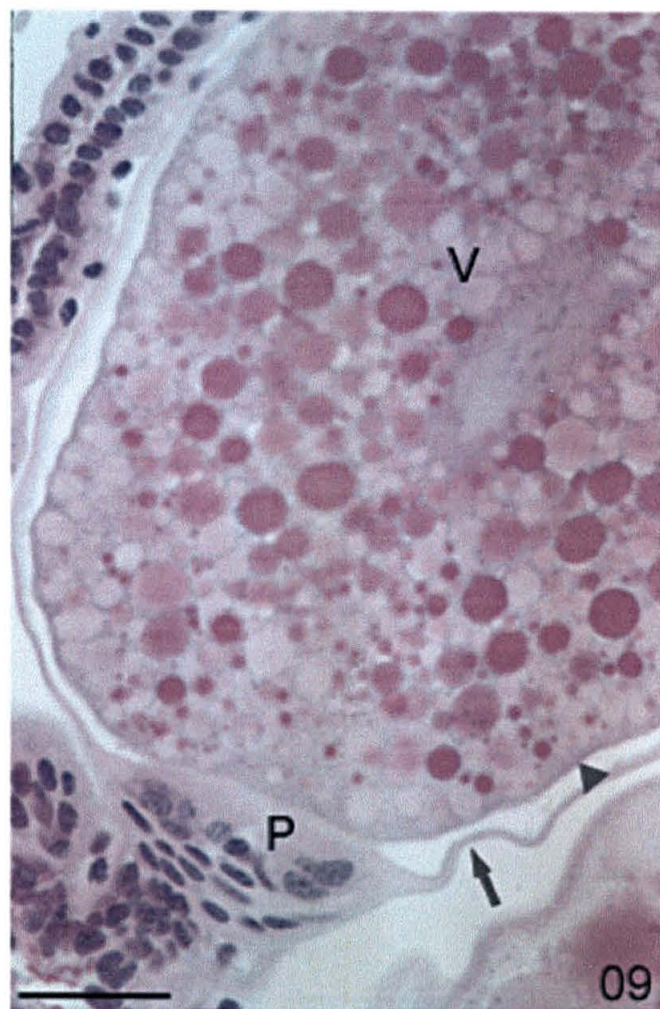


FIGURA 10A E 10B: O ovócito maduro, caracterizado em estágio VI é observado entrando no lúmen ovariano. Para permitir a passagem do ovócito o epitélio ovariano alarga-se (E), e as células do pedúnculo justapostas ao ovócito (→) separam-se para formar uma estreita passagem. Pode-se observar o ovócito no lado externo (OE) e interno do lúmen (OI). No momento da internalização o citoplasma sofre mudanças estruturais drásticas, com total rearranjo dos grânulos de vitelo, sendo que a maioria dos grânulos presentes no citoplasma ainda no lado externo são maiores (G), e os grânulos no citoplasma já internalizado são menores (g). Quando internalizado, o ovócito é envolvido somente pela membrana vitelínica (▶), e a lâmina basal e a banda protéica que o recobriam permanecem no lado externo (L) presas às células que formam a passagem para o ovócito. **10A.:** Coloração: HE. Barra: 45µm. **10B.:** Coloração: HE. Barra: 180µm.

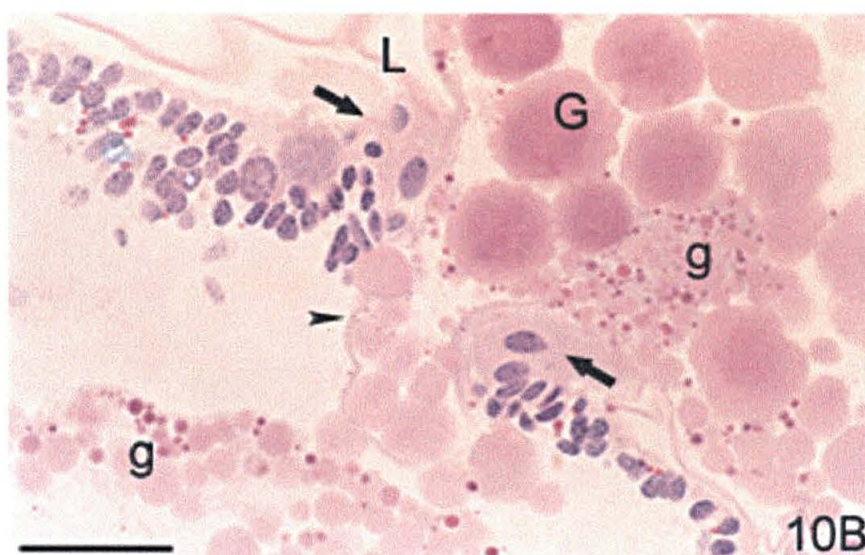
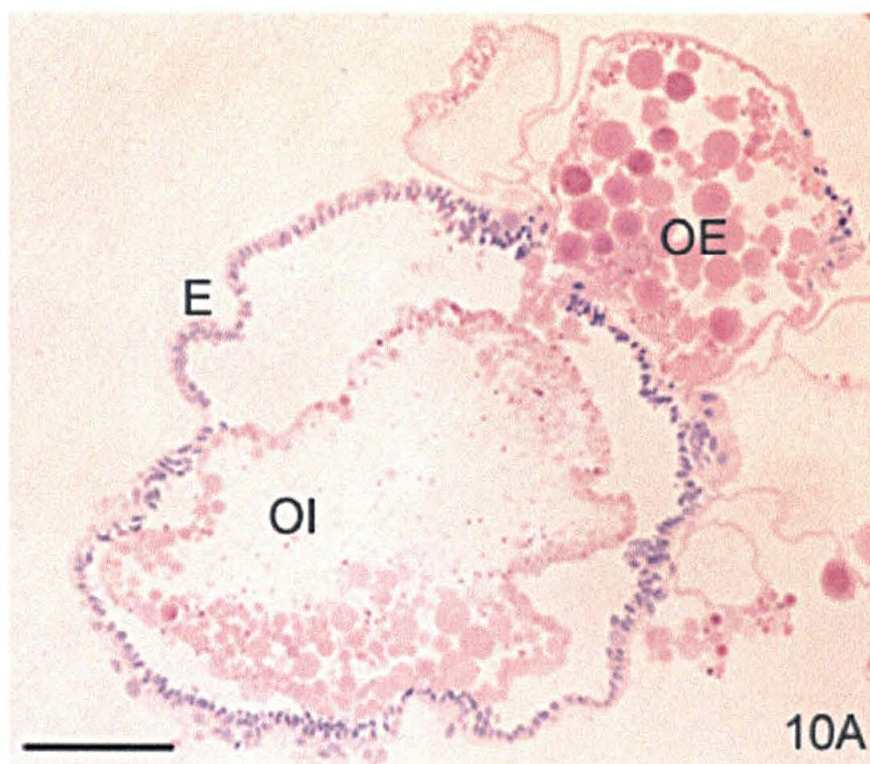
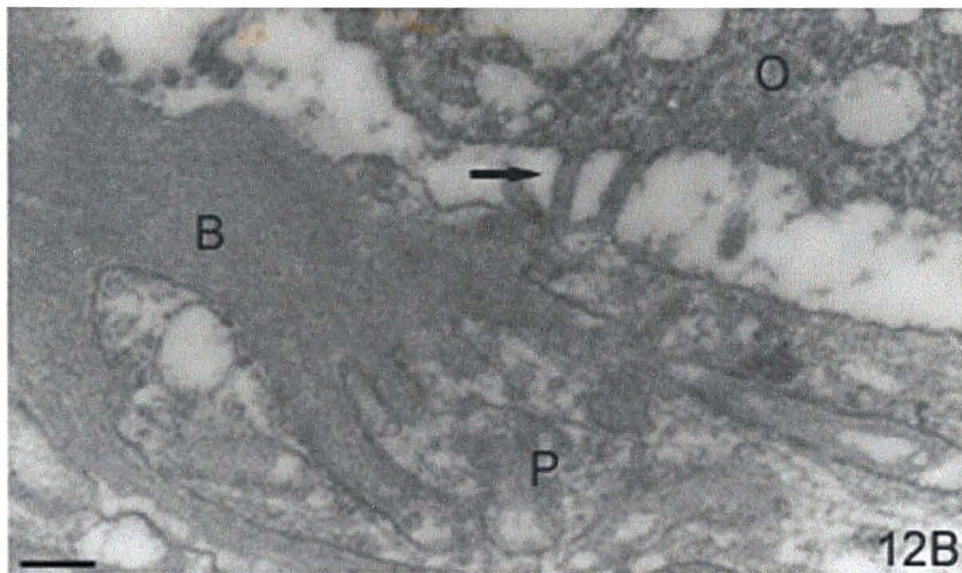
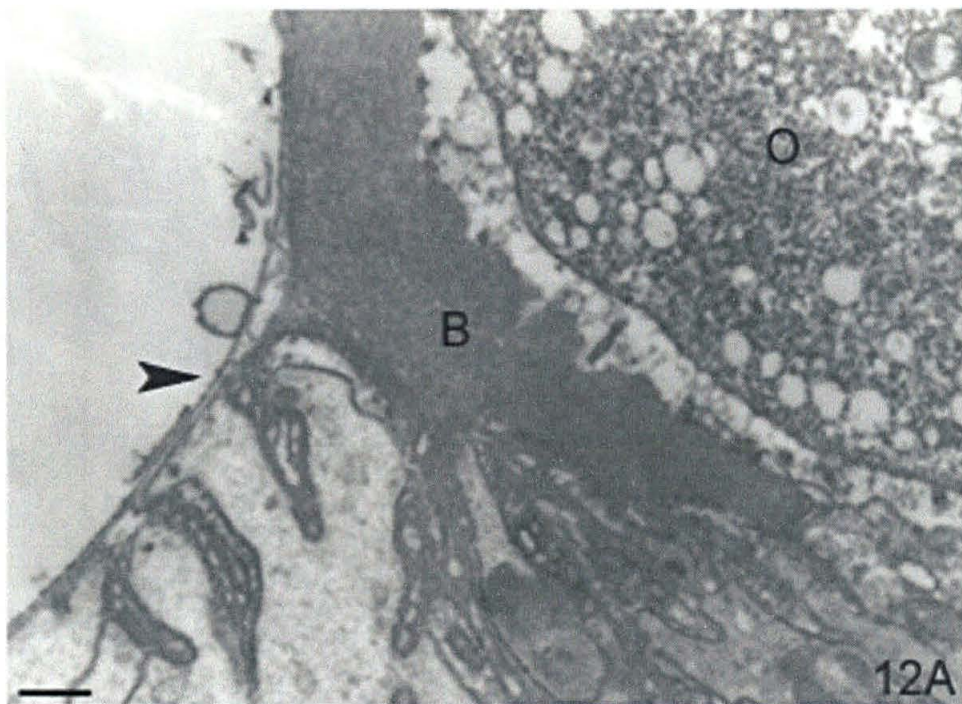


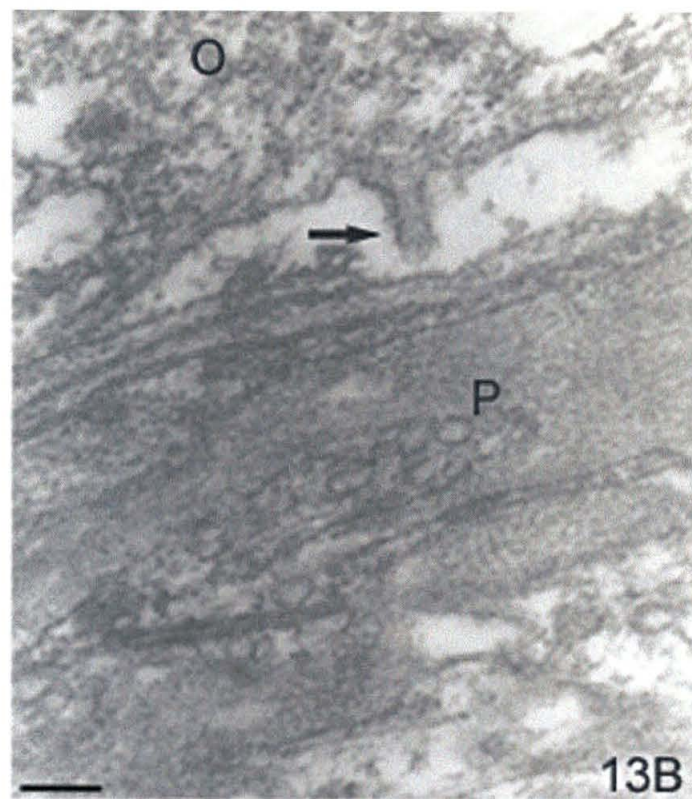
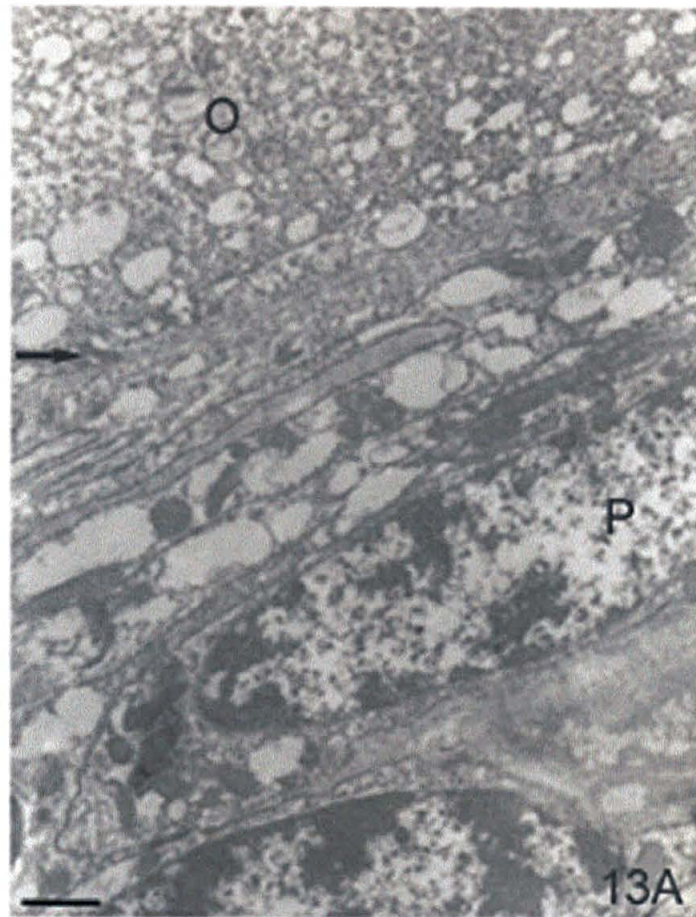
FIGURA 11: Após a entrada do ovócito no lúmen ovariano, a lâmina basal remanescente pode ser observada juntamente com a banda protéica (→). As células do pedúnculo perderam seu arranjo e encontram-se soltas, juntamente com a lâmina basal. Na mesma área pode-se observar ovócitos do tipo III, característica do processo contínuo da oogênese nesta espécie. Coloração: HE. Barra: 45µm.



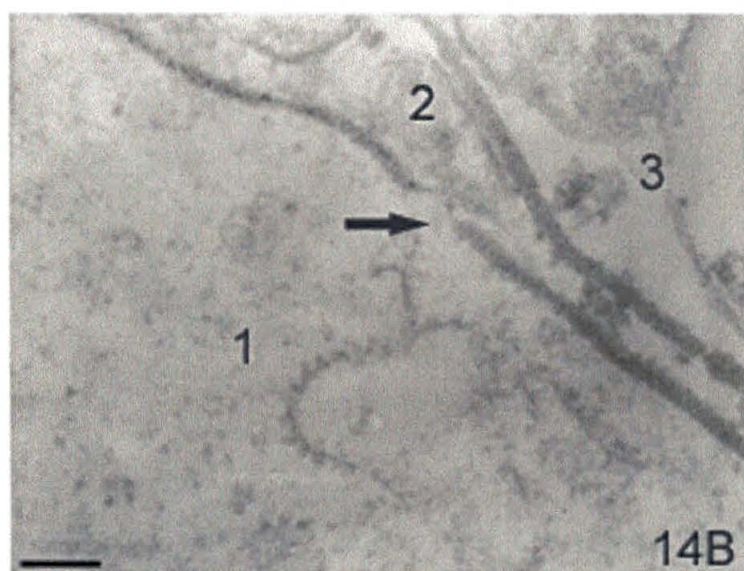
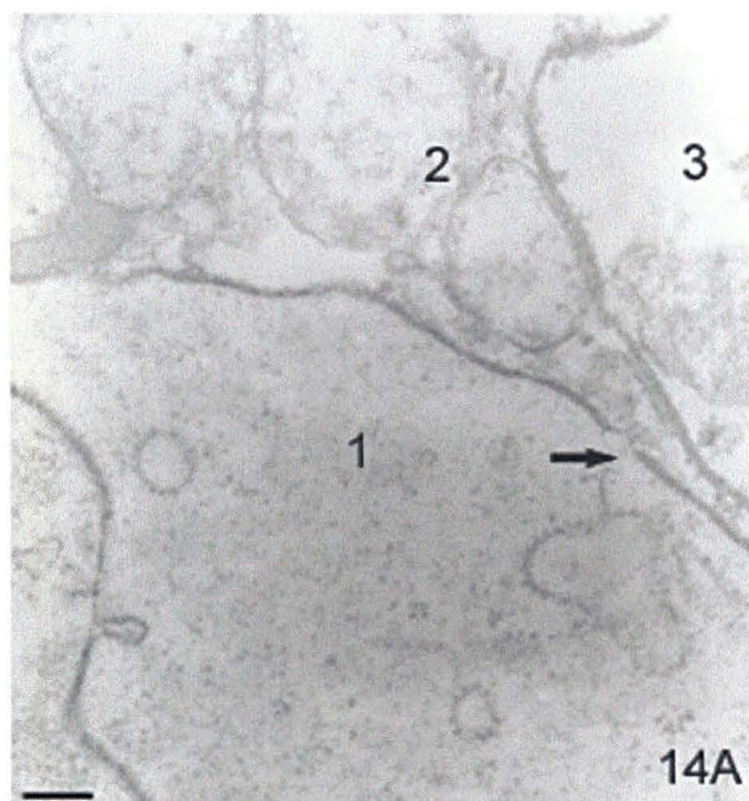
FIGURA 12A E 12B: Microscopia eletrônica de transmissão. A lâmina basal que envolve o ovócito (O) aparece como uma delgada membrana (▶) e, abaixo dela aparece uma espessa banda protéica (B). Em detalhe, observa-se que esta banda emite projeções na direção da célula do pedúnculo mais periférica (P). Microvilosidades foram encontradas na região entre o ovócito e a célula do pedúnculo (→). **12A.**: Barra: 1µm. **12B.**: Barra: 200nm.



FIGURAS 13A E 13B: A interface entre o ovócito (O) e célula do pedúnculo (P) possui várias microvilosidades (\rightarrow). **13A.** Barra: $1\mu\text{m}$. **13B.** Barra: 200nm .



FIGURAS 14A E 14B: As células do epitélio ovariano (1,2 e 3) encontram-se justapostas e comunicam-se através de junções do tipo gap (\rightarrow). **14A.:** Barra: 200nm. **14B.:** Barra: 100nm.



FIGURAS 15A. E 15B: Os espaços intercelulares das células que compõem o pedúnculo aparecem eletrondensos pela marcação com nitrato de lantânio (\rightarrow). As regiões de contato das membranas plasmáticas não permitem a passagem do traçador e podem ser caracterizadas morfologicamente como junções celulares do tipo gap (\blacktriangleright). **15A.:** Barra: 500nm. **15B.:** Barra: 200nm.

FIGURA 15C: Observar partículas intramembranas na junção gap (\blacktriangleright). Barra: 50nm.

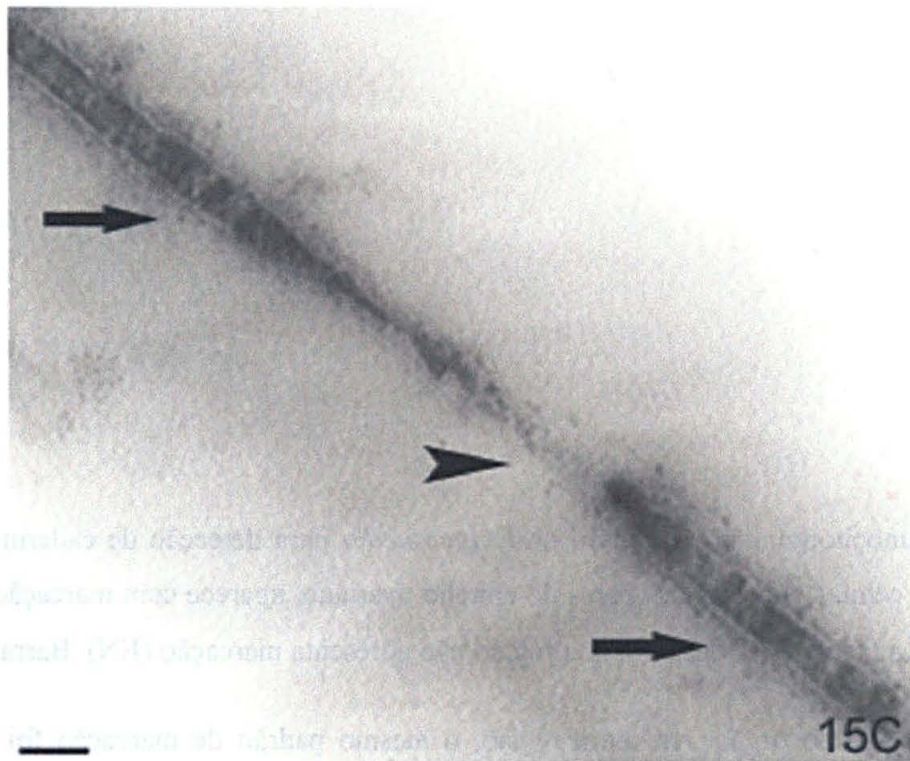
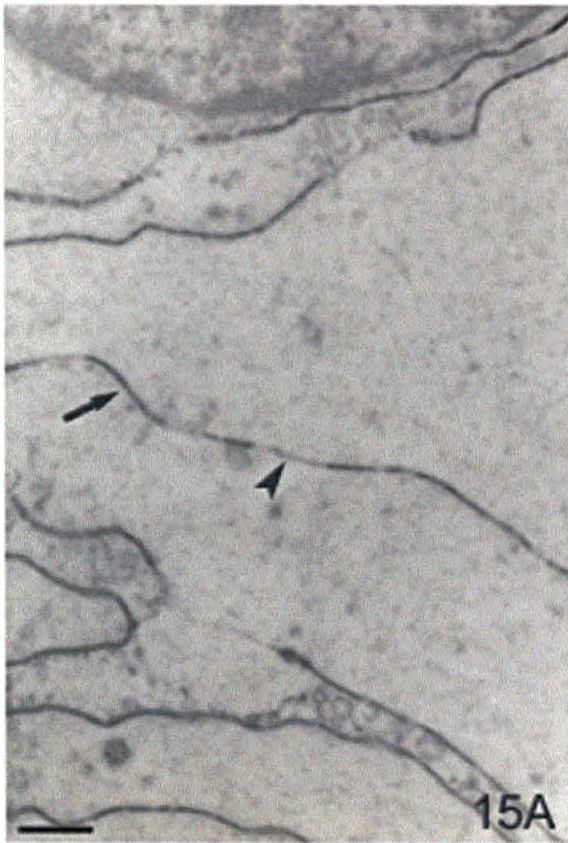


FIGURA 16: Imunocitoquímica em ovário de *L. intermedia* para detecção de caderina. Coloração: HE. Um grupo de células, em uma das faces do epitélio ovariano, aparece com marcação positiva para a caderina (EC), e a face oposta desta mesma região não apresenta marcação (EN). Barra: 45µm.

FIGURA 17: No mesmo órgão, em outra região, o mesmo padrão de marcação foi observado no epitélio ovariano, mas entre as células do grupo marcado agora pode-se observar um ovócito do tipo I, em início de desenvolvimento (→). Coloração: HE. Barra: 45µm.

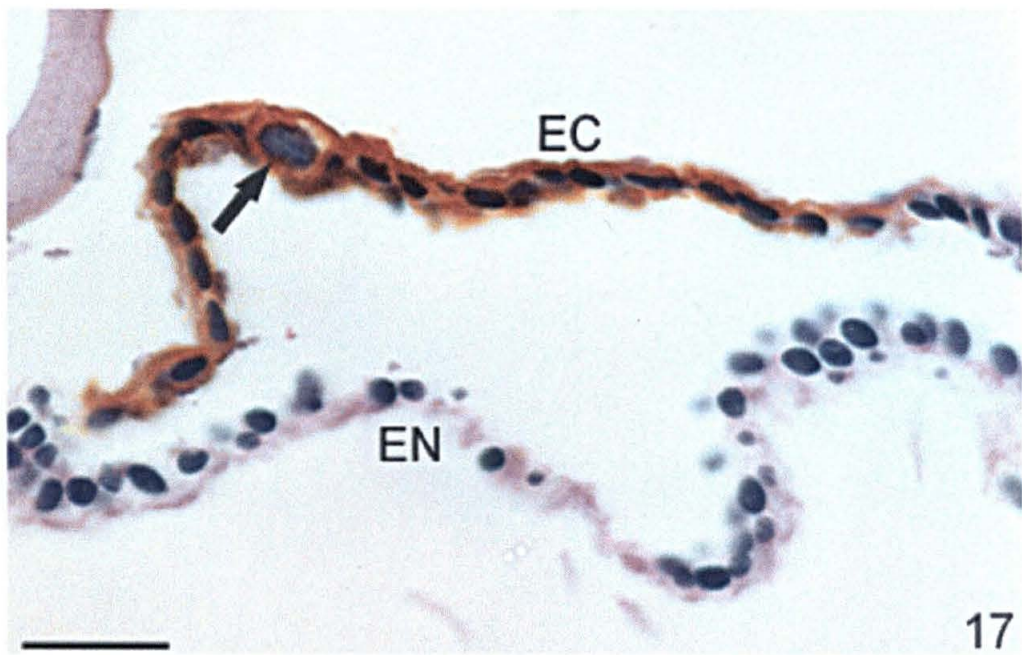
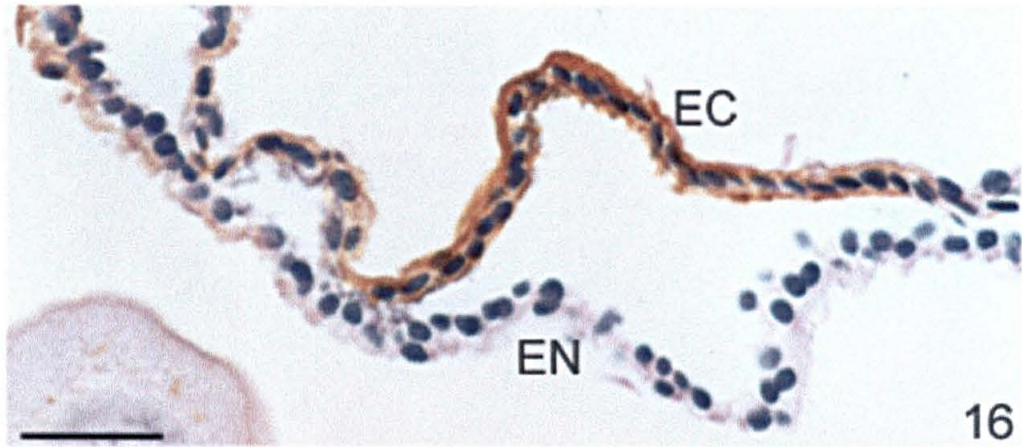


FIGURA 18: Um ovócito em estágio II aparece com marcação positiva para caderina no citoplasma e em todo seu perímetro, assim como suas células adjacentes. Coloração: HE. Barra: 45µm.

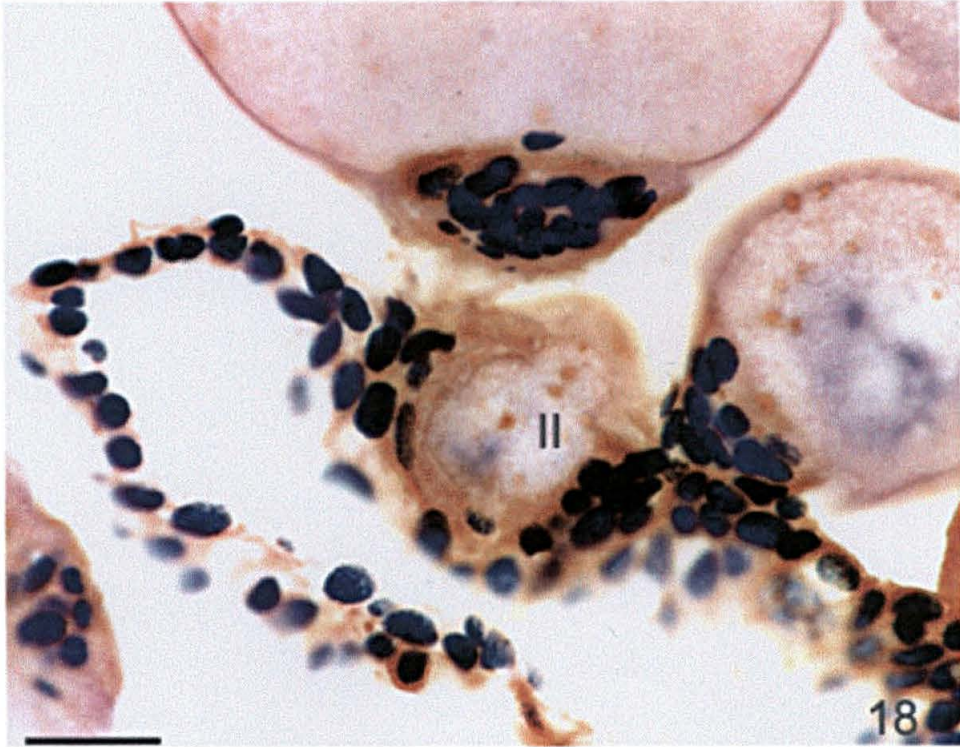


FIGURA 19: Detalhe de um ovócito do tipo II. A marcação para caderina aparece pontual em torno do núcleo evidente (→). Observar a marcação polarizada no epitélio ovariano (+ e -). Coloração: HE. Barra: 40µm.

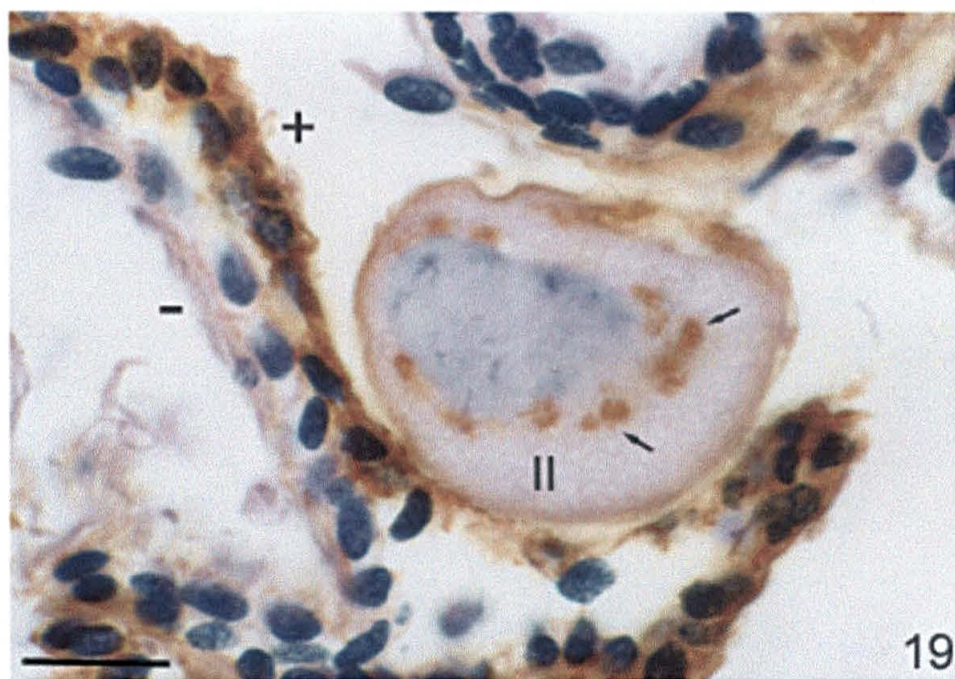


FIGURA 20: Em uma mesma região do ovário observa-se ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento. Ovócitos do tipo II apresentam marcação em seu perímetro (→). Ovócitos do tipo III apresentam marcação pontual no citoplasma, assim como as células do pedúnculo (P). Observar a interface ovócito-células folicular, com nítida marcação. Coloração: HE. Barra: 45µm.

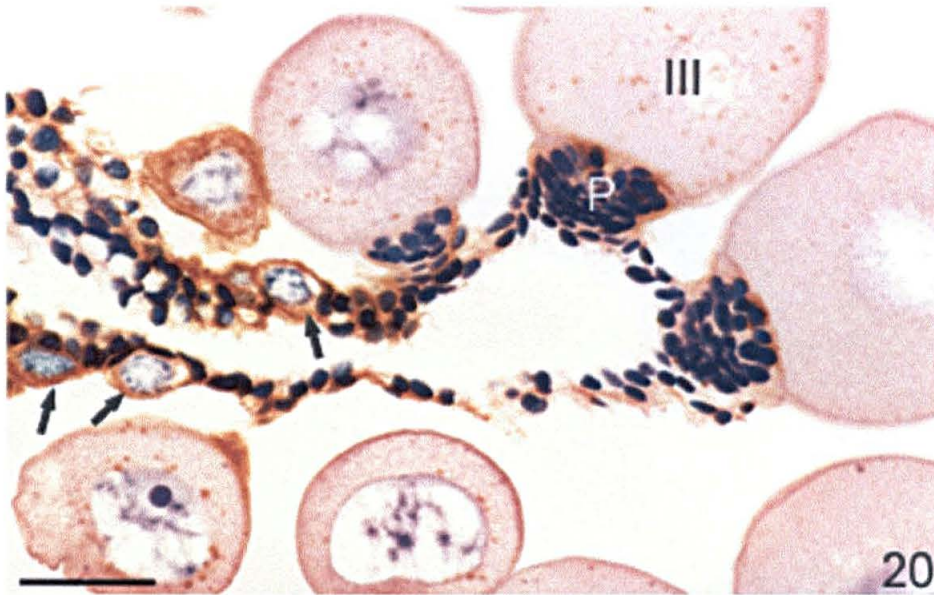


FIGURA 21: O ovócito do tipo III apresenta marcação pontual para caderina no citoplasma, e uma delgada linha marcada aparece na região de contato do ovócito com a lâmina basal (→). O pedúnculo de um ovócito menos desenvolvido apresenta marcação mais forte (►) do que o pedúnculo do ovócito mais desenvolvido (P). Coloração: HE. Barra: 45µm.

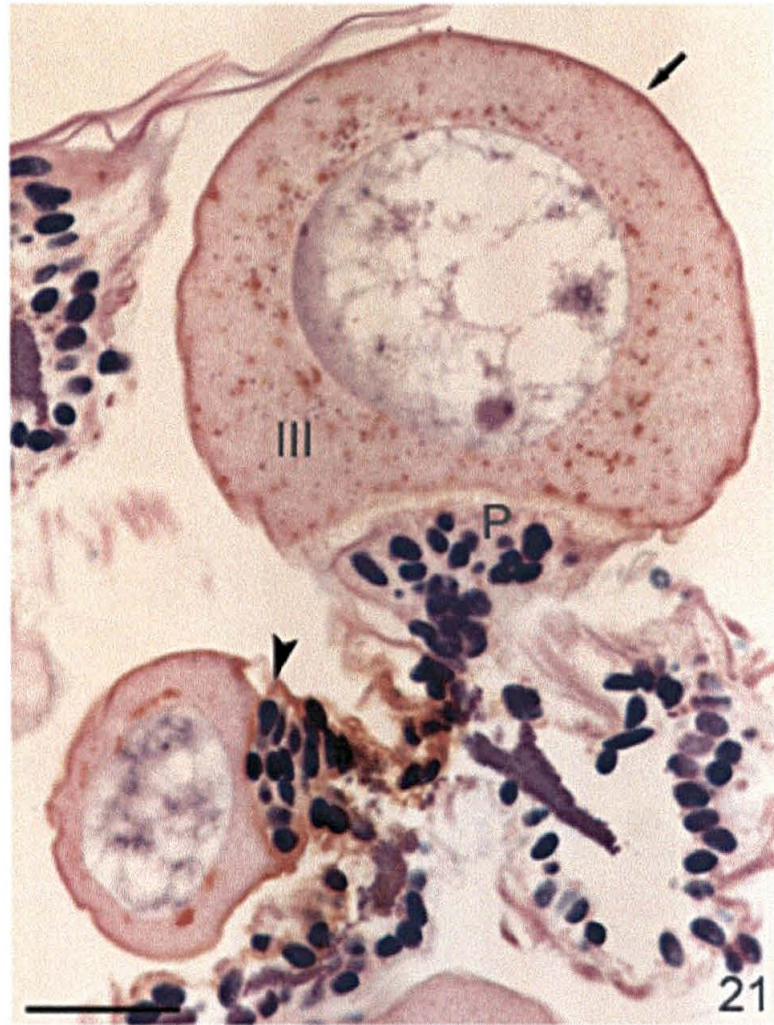


FIGURA 22: O ovócito do tipo V apresenta fraca marcação pontual no citoplasma (►), assim como entre as células do pedúnculo (→). Coloração: HE. Barra: 40µm.



FIGURA 23: O ovócito do tipo VI está preparado para sua entrada no lúmen ovariano. As duas células do pedúnculo mais próximas ao ovócito mudaram sua morfologia, sendo agora as únicas em contato com a célula germinativa (→). A marcação para caderina aparece no contato entre estas células (►). Coloração: HE. Barra: 40µm.

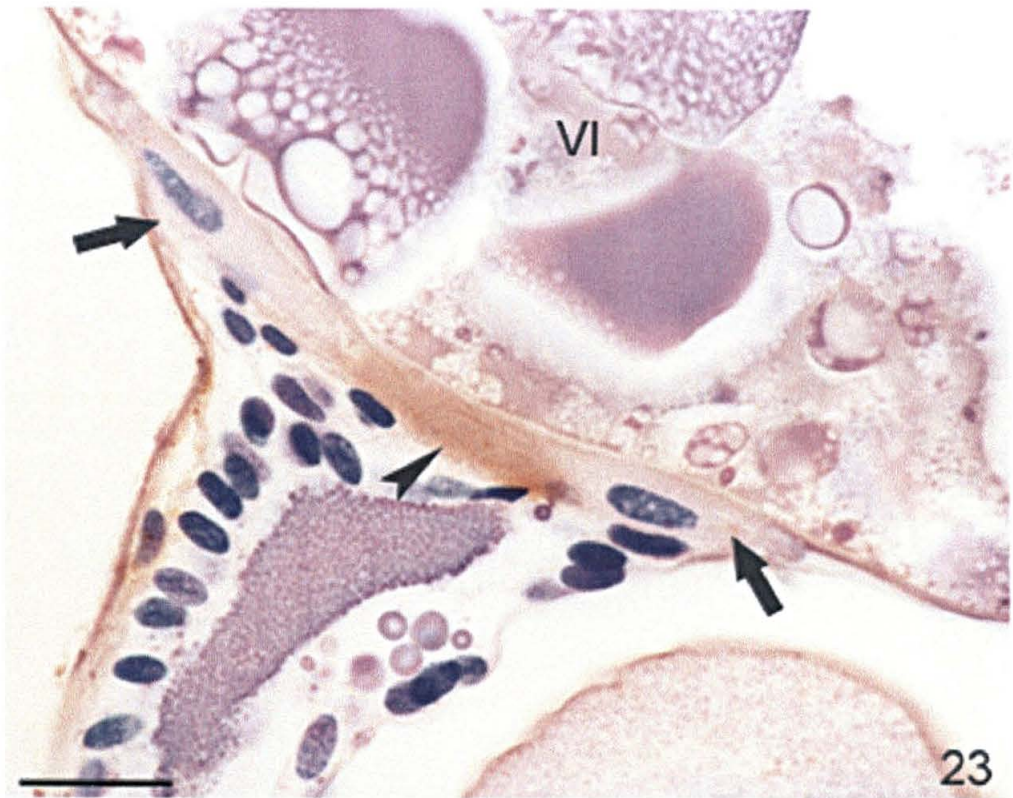


FIGURA 24: Em um estágio mais avançado, o ovócito do tipo VI está prestes a entrar no lúmen, uma vez que as células do pedúnculo já se separaram (→). Nenhum traço de marcação é visível no ovócito e no pedúnculo. Coloração: HE. Barra: 45µm.

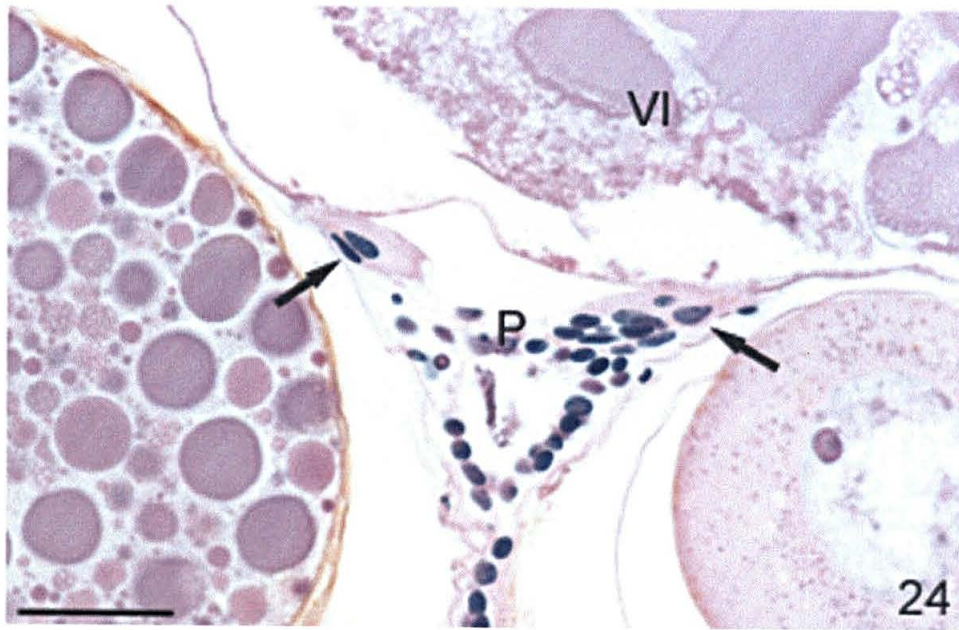


FIGURA 25: Material controle. Não há presença de marcação para caderina no epitélio ovariano (E), no ovócito do tipo I (→) e III, assim como no seu pedúnculo (P). Coloração: HE. Barra: 45µm.

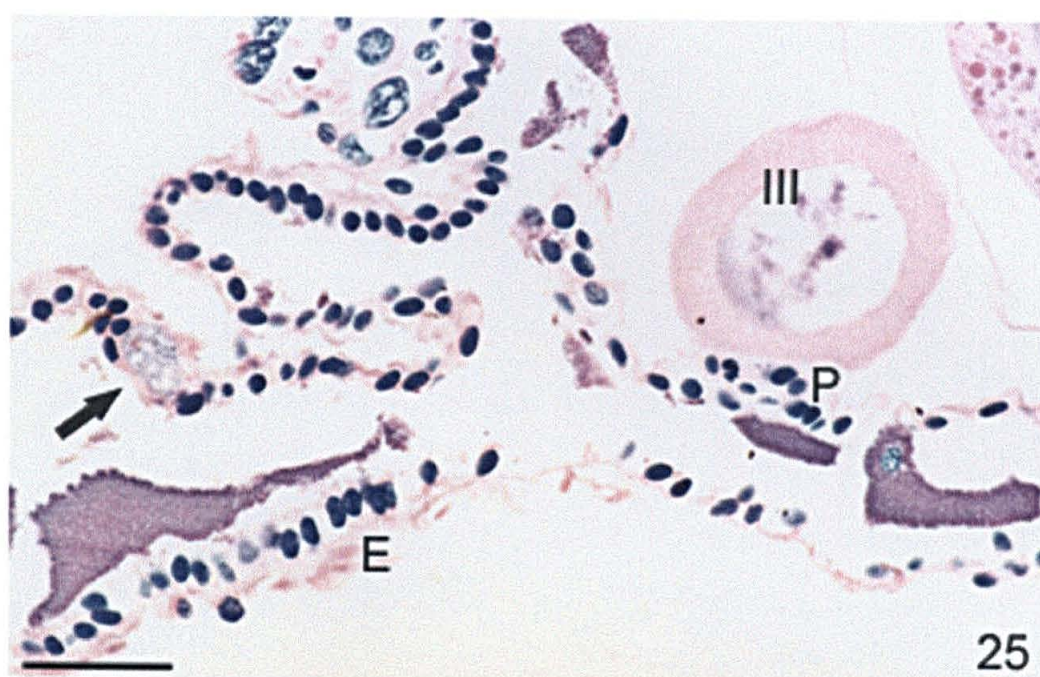
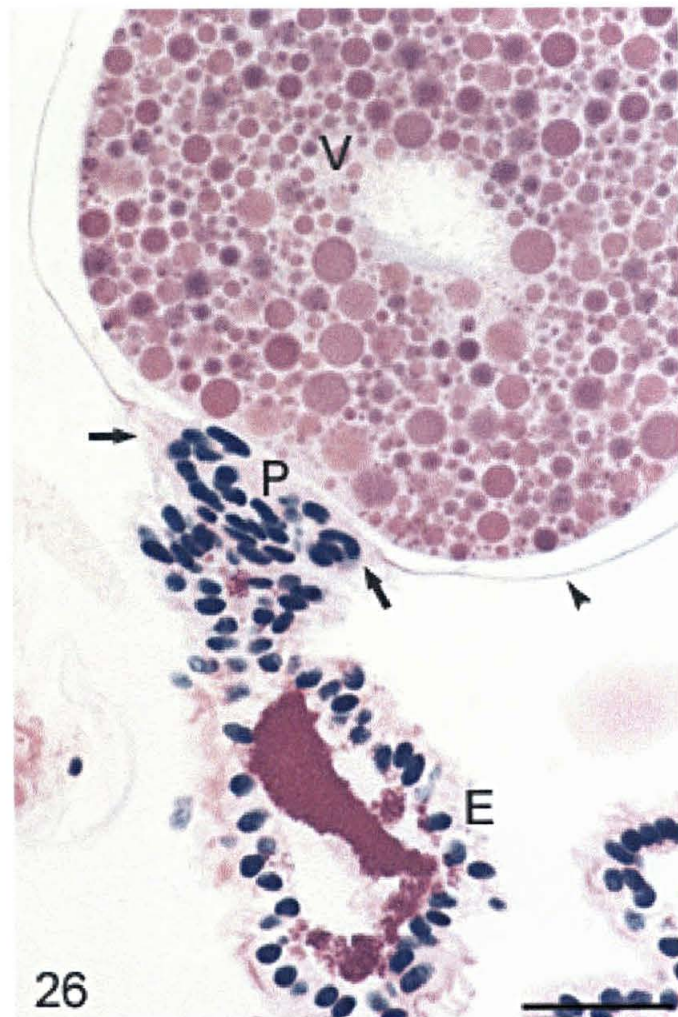


FIGURA 26: O controle para o ovócito V não apresenta marcação para caderina no epitélio (E), pedúnculo (P), lâmina basal (►) ou nas células adjacentes ao ovócito (→).Coloração: HE. Barra: 45µm.



6. DISCUSSÃO

A morfologia do aparelho reprodutor feminino de *Loxosceles intermedia* é semelhante à de outras espécies relacionadas. A disposição dos ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento presos à parede ventral do epitélio ovariano e recobertos pela lâmina basal é encontrada em diferentes grupos (Warbug e Rosenberg, 1992; Warbug et al, 1995, Ikuta e Makioka, 1995).

Em *L. intermedia* foi possível observar, além da lâmina basal, uma espessa banda protéica sob esta lâmina, característica não descrita em tais espécies. Esta banda protéica deve potencializar as funções de sustentação, proteção mecânica e de isolamento, realizadas normalmente pela lâmina basal, uma vez que a célula germinativa permanece exposta ao ambiente da cavidade abdominal. A lâmina basal deve ser necessária também exercendo função regulatória, associada a outros estímulos externos, atuando na expressão de proteínas assim como no processo de diferenciação da célula germinativa.

O desenvolvimento dos ovócitos em *L. intermedia* foi didaticamente classificado em estágios, de acordo com as características morfológicas da célula germinativa. Tal classificação é realizada em diferentes espécies de invertebrados, principalmente insetos, baseada nos estágios vitelogênicos. A caracterização e classificação do processo de vitelogênese é um relevante campo de estudo para *L. intermedia*, ainda a ser desenvolvido.

Os ovócitos em início de desenvolvimento foram observados entre as células do epitélio ovariano em *L. intermedia*, assim como descrito para a espécie *Rodnius prolixus* (Huebner e Anderson, 1972). Porém, em *L. intermedia*, a delimitação do ovócito por membrana plasmática é evidente mesmo nos estágios iniciais, refutando a possibilidade de desenvolvimento da célula germinativa em um sincício.

Em *L. intermedia*, os ovócitos já diferenciados protraem do epitélio ovariano através do aumento citoplasmático constante, e são presos a este epitélio por um

pedúnculo. Uma característica interessante observada foi a de que estes ovócitos não estão contidos em folículos, nem estão rodeados por células foliculares. As únicas células em contato com o ovócito são aquelas que o sustentam e o conectam ao epitélio ovariano – as células do pedúnculo. Apesar de evidências mostrarem a capacidade do ovócito sintetizar macromoléculas, a incorporação de vitelo é a responsável principal no processo de vitelogênese (Yano, 1999). A célula folicular é o principal meio que o ovócito utiliza para a captação de vitelo, além de desempenhar várias outras funções durante o processo de oogênese, como mediadora de sinais (York, 1993). Em *L. intermedia* as únicas células candidatas a esta função de célula folicular são as células do pedúnculo, pois estão suficientemente próximas ao ovócito e apresentam características morfológicas compatíveis.

Não foi possível caracterizar em *L. intermedia* uma região do ovário que contivesse o *pool* de células tronco de linhagem germinativa, ou qualquer estrutura similar ao germário. A investigação sobre a origem e manutenção das células tronco de linhagem germinativa é essencial para a perfeita compreensão do processo de oogênese em *L. intermedia*, e representa objeto de futuros estudos.

A caderina é responsável pela manutenção da célula tronco de linhagem germinativa (Song et al, 2002), assim como para o correto posicionamento do ovócito no folículo ovariano de *Drosophila*. A acentuada concentração desta molécula foi observada na célula de linhagem germinativa no início da oogênese e nas células foliculares relacionadas à ela (González-Reyes e Johnston, 1998; Niewiadomska et al, 1999). O padrão de marcação para a caderina encontrado no epitélio ovariano de *L. intermedia* sugere delimitação de regiões e segregação a apenas uma das faces do epitélio. Nestas regiões marcadas todas as células possuem as mesmas características morfológicas de células epiteliais. A marcação sugere a presença da célula germinativa indiferenciada como uma célula caracteristicamente epitelial, uma vez que ovócitos do tipo I foram encontrado em regiões delimitadas com marcação positiva para a caderina. Os ovócitos estão presentes somente na face ventral do ovário, e esta polaridade na marcação evidencia a presença de células germinativas somente entre as

células do epitélio ventral. Os diferentes padrões de marcação para a caderina ao longo do desenvolvimento das células germinativas indicam um possível padrão de regulação desta molécula, podendo atuar como sinalizadora celular (Gumbiner, 2000).

A presença da caderina em uma delimitada região do epitélio ovariano sugere a formação de um conjunto celular diferenciado, que terá domínios de membrana singulares e que segregará proteínas particulares, formando um ambiente diferenciado dentro de um mesmo epitélio. A presença da caderina neste grupo de células sugere também que haverá uma associação diferenciada das proteínas do citoesqueleto, e estas modificações significam mudanças na sinalização celular (Yeaman et al, 1998). Este conjunto de ações podem levar à diferenciação da célula germinativa.

Ovócitos do tipo II aparecem com marcação positiva para caderina no citoplasma, primariamente como pontos ao redor do núcleo e posteriormente como pequenos pontos em todo o citoplasma. Ovócitos do tipo III aparecem com este padrão de marcação mais fraco, assim como ovócitos do tipo IV. A diminuição neste padrão de marcação pode se dever ao aumento do volume citoplasmático ao longo do desenvolvimento da célula germinativa. A mesma concentração da proteína pode estar presente em todos os estágios de desenvolvimento do ovócito, mas parecendo mais dispersa em ovócitos maiores. A presença de caderina no citoplasma sugere a função de um *pool* materno desta molécula no ovócito, que será utilizado no início da embriogênese (Cerdá et al, 1999).

A presença de marcação também foi observada nas células do pedúnculo e na interface ovócito-célula folicular em *L. intermedia*. As células do pedúnculo devem possuir junções de adesão para a manutenção deste conjunto de células como uma unidade morfológica distinta. Em ovócitos do tipo IV, a marcação em seu pedúnculo aparece somente na área de contato das duas células que fazem contato com o ovócito, sem traço de marcação nas células adjacentes. Quando estas células se afastam para a formação da abertura, não houve marcação em nenhuma das células do pedúnculo. O rearranjo destas células necessário para a liberação do ovócito é evidenciado por estas diferentes marcações observadas.

Ovócitos e células foliculares estão unidos por contatos, com presença de marcação para caderina na interface celular e, apesar da adesão por caderina entre tipos celulares diferentes não ser comum, foi observada em *Xenopus* (Müeller et al, 1992) e em uma espécie de peixe (Cerdá et al, 1999). Esta adesão heterotípica caracteriza a estreita relação entre células somáticas e germinativas, podendo funcionar no estabelecimento da arquitetura folicular e na manutenção de microvilosidades. A presença de caderina desta forma corrobora os dados obtidos em microscopia eletrônica de transmissão, pois microvilosidades foram observadas em toda a extensão da interface ovócito-célula folicular. As microvilosidades representam o alto grau de atividade metabólica da vitelogênese e a interação existente entre células foliculares e ovócitos nesta fase do desenvolvimento da célula germinativa.

Junções do tipo gap entre as células do epitélio e do pedúnculo foram observadas, nas mesmas regiões com marcação positiva para a caderina, e esta molécula pode ser o pré-requisito para a formação de tais junções (Müeller et al, 1992; Matsuzaki et al, 1990). Estas junções observadas em *L. intermedia* demonstraram possuir, em outros grupos, função crucial no processo da oogênese, sendo responsáveis pela comunicação e sinalização celular rápida, mantendo assim um conjunto celular coeso, além de atuarem no transporte de moléculas (Ullmann, 1973; York, 1983).

A liberação do ovócito para o lúmen ovariano parece ser descrito pela primeira vez neste trabalho. Em *L. intermedia*, os pedúnculos de ovócitos do tipo IV foram observados com morfologia peculiar. As células do pedúnculo se rearranjaram, com apenas duas células com marcação positiva para a caderina mantendo contato com a célula germinativa. Estas duas células se separam, perdendo esta marcação, e se abrem para a passagem do ovócito para dentro do lúmen ovariano, e o epitélio alarga-se para conter o ovócito em seu lúmen. O ovócito sofre drástico rearranjo citoplasmático, provavelmente devido a mudanças em seu citoesqueleto para possibilitar sua passagem na pequena abertura formada no epitélio pelas células do pedúnculo. A presença de ovócitos no lúmen ovariano já foi registrada (Ikuta e Makioka, 1997), assim como cicatrizes de pedúnculos deixadas após a liberação do ovócito (Warbug,

1995) e considerações acerca deste mecanismo foram discutidas, com suposições de que o ovócito poderia ser liberado na cavidade abdominal ou internalizado no lúmen ovariano (Valente, 1984). É pouco provável que o ovócito possa ser liberado na cavidade abdominal pois, apesar de se desenvolver no lado externo do epitélio ovariano, sua locomoção por entre o hepatopâncreas até a abertura genital seria extremamente difícil e errante. Os trabalhos que possuem o registro de ovócitos no lúmen ovariano não fazem qualquer tipo de suposição sobre os mecanismos utilizados pela célula germinativa para atingi-lo. Todas as modificações que ocorrem no momento da liberação do ovócito devem ser respostas coordenadas por estímulo hormonal e sinalização derivada de mudanças na adesão celular, processos que ainda devem ser analisados.

As modificações estruturais e morfológicas do ovócito e das células do pedúnculo são drásticas. A investigação da atividade do citoesqueleto deste tipos celulares e a dos mecanismos de controle e sinalização de tais mudanças é de considerável interesse.

7. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- A morfologia do aparelho reprodutor feminino de *Loxosceles intermedia* possui o padrão descrito para o grupo;
- A oogênese em *L. intermedia* é um processo contínuo em toda a extensão do ovário, com ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento em uma mesma área deste órgão, em seu lado ventral, que possui regiões delimitadas com presença de caderina. O padrão de marcação para caderina foi encontrado também no citoplasma dos ovócitos e nas células do pedúnculo, com padrão distinto para cada estágio;
- De acordo com as características morfológicas, os ovócitos foram classificados em ovócitos dos tipos I, II, III, IV, V e VI;
- O pedúnculo é formado por células epiteliais adjacentes ao ovócito, formando uma estrutura celular coesa, sendo as únicas células em contato com o ovócito ao longo de todo seu desenvolvimento, podendo suas células terem as funções de células foliculares;
- Junções do tipo gap estão presentes entre as células do epitélio ovariano e entre as células do pedúnculo, e microvilosidades foram identificadas em toda a extensão da interface ovócito-célula folicular;
- Ovócitos maduros são liberados para o lúmen ovariano através de uma abertura, consequência do afastamento das células do pedúnculo, e o epitélio ovariano se alarga para comportar este ovócito, agora recoberto somente pela membrana vitelínica;
- Após a liberação do ovócito, a lâmina basal e a banda protéica permanecem presas às células do pedúnculo, que perde seu arranjo estrutural.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

ANDERSON, L. M. Protein synthesis and uptake by isolated *Cecropia* oocytes. **J. Cell Sci.**, p. 82735-82750, 1971.

BILINSKI, S. M.; SZKLARZEWICZ, T. The ovary of *Catajapyx aquilonaris* (Insecta, Entognatha): ultrastructure of germarium and terminal filament. **Zoomorphology**, v. 112, p. 247-251, 1992.

BOHRMANN, J.; HAAS-ASSENBAUM, A. Gap junctions in ovarian follicles of *Drosophila melanogaster*: Inhibition and promotion of dye-coupling between oocyte and follicle cells. **Cell Tissue Res.**, v. 273, p. 163-173, 1993.

BUCKUP, E. H. Variação interpopulacional dos receptáculos seminais em aranhas do grupo Spadicea do gênero *Loxosceles* HEINECKEN & LOWE, 1832 (Araneae, Scytodidae). **Iheringia. Sér. Zool.**, Porto Alegre, v. 55, n. 137, p. 147, 1980.

BÜNING, J. **The insect ovary – Ultrastructure, previtellogenic growth and evolution**. London: Chapman and Hall, 1994.

CADERNOS DE SAÚDE: **Loxosceles: “a aranha-marrom”**. Ano I, n. 2. Prefeitura da cidade de Curitiba, 1993.

CERDÁ, J.; PRÄTZEL, S.; FRANKE, W. W. Cadherin-catenin complexes during zebrafish oogenesis: heterotypic junctions between oocytes and follicles cells. **Biol. Reprod.**, v. 61, p. 692-704, 1999.

ECKELBARGER, K. J. Oocytic nutrition in the lower Metazoa: The Scyphozoa. In: Jr., WILSON, W. H. (Ed). **Reproduction and Development of Marine Invertebrates**. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, p. 15-28, 1994.

FISCHER, M. L. **Biologia e ecologia de *Loxosceles intermedia* Mello Leitão, 1934 (Araneae, Sicariidae) no município de Curitiba, Paraná**. Curitiba, 1996. Dissertação de Mestrado, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FOELIX, R. F. **Biology of spiders**. 2. ed. New York: Harvard Press, Cambridge, 1982.

GERTSCH, W. The spider genus *Loxosceles* in South America. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 136, p. 121-182, 1967.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**: New York: Plenum Press, 1991. v. 07: A Comprehensive synthesis. A Conceptual History of Modern Embryology.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. 6. ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 2000.

GONZÁLEZ-REYES, A.; JOHNSTON, D. S. The *Drosophila* AP axis is polarised by the cadherin-mediated positioning of the oocyte. **Development**, v. 125, p. 3635-3644, 1998.

GUMBINER, B. M. Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, v. 84, p. 345-357, 1996.

GUMBINER, B. M. Regulation of cadherin adhesive activity. **J. Cell Biol.**, v. 148, n. 03, p. 399-403, 2000.

HUEBNER, E.; ANDERSON, E. A cytological study of the ovary of *Rhodnius prolixus*. I. The ontogeny of the follicular epithelium. **J. Morphol.**, v. 136, p. 459-494, 1972.

HUEBNER, E. Oocyte-follicle cell interaction during normal oogenesis and atresia in an insect. **J. Ultrastruc. Res.**, v. 74, p. 95-104, 1981.

IKUTA, K.; MAKIOKA, T. Structure of the adult ovary and oogenesis in *Argulus japonicus* Thiele (Crustacea: Branchiura). **J. Morphol.**, v. 231, p. 29-39, 1997.

JAMUR, M. C.; FARACO, C. D.; LUNARDI, L.; SIRAGANIAN, R. P.; OLIVER, C. Microwave fixation improves antigenicity of glutaraldehyde-sensitive antigens while preserving ultrastructural detail. **J. Histochem. Cytochem.** v. 43, p. 307-311, 1995.

KO, K.; ARORA, P. LEE, W.; McCULLOCH, C. Biochemical and functional characterization of intercellular adhesion and gap junctions in fibroblasts. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 279, p. C147-C157, 2000.

LAW, J. H. Insect egg proteins other than vitellin. **Adv. Inv. Reprod.**, v. 5, p. 97-102, 1990.

MATOVA, N.; COOLEY, L. Comparative Aspects of Animal Oogenesis. **Dev. Biol.**, v. 231, p. 291-320, 2001.

MATSUZAKI, F.; MEGE, R. M.; JAFFE, S. H.; FRIEDLANDER, D. R.; GALLIN, W. J.; GOLDBERG, J. I.; CUNNINGHAM, B. A.; EDELMAN, G. M. c-DNA of cell adhesion molecules of different specificity induce changes in cell shape and border formation in cultured S180 cells. **J. Cell Biol.**, v. 110, p. 1239-1252, 1990.

MAZZINI, M.; GIORGI, F. The follicle cell-oocyte interaction in ovarian follicles of the stick insect *Bacillus rossius* (Rossi): (Insecta:Phasmatodea). **J. Morphol.**, v. 185, p. 37-49, 1985.

MELLO-LEITÃO. Espécies brasileiras do gênero *Loxosceles lowe*. **Ann. Acad. Bras. De Ciencias**, v. VI, n. 2, 1934.

MÜLLER, A. H. J.; HAUSEN, P. U-cadherin in *Xenopus* oogenesis and oocyte maturation. **Development**, v. 114, p. 533-543, 1992.

NIEWIADOMSKA, P. GODT, D. TEPASS, U. DE-cadherin is required for intercellular motility during *Drosophila* oogenesis. **J. Cell Biol.**, v. 144, n. 3, p. 533-547, 1999.

OSAKI, H. Electron microscope studies on developing oocytes of the spider *Pexipus paykulli*. **Annot. Zool. Jap.**, v. 4, p. 187-200, 1972.

PINTO-CORREIA, C. **O Ovário de Eva**. Rio de Janeiro: Ed. Campus, 1999.

PLATNICK, N. I.; CODDINGTON, J. A.; FORSTER, R. R.; GRISWOLD, C. E. Spinneret morphology and the phylogeny of Haplogyne Spiders (Araneae, Araneomorphae). **Am. Mus. Nat. Hist.**, New York, v. 3016, p. 1-73, 1991.

PROWSE, D. M.; CADWALLADER, G. P.; PITTS, J. D. E-cadherin expression can alter the specificity of gap junction formation. **Cell Biol. Int.**, v. 21, n. 12, p. 833-843, 1997.

SASTRY, S. K.; HORWITZ, A. F. Adhesion-growth factor interactions during differentiation: an integrated biological response. **Dev. Biol.**, v. 180, p. 455-467, 1996.

SONG, X.; ZHU, C.; DOAN, C.; XIE, T. Germline stem cells anchored by adherens junctions in the *Drosophila* ovary niches. **Science**, v. 296, p. 1855-1857, 2002.

TAZUKE, S. I.; SCHULZ, C.; GILBOA, L.; FOGARTY, M.; MAHOWALD, A. P.; GUICHET, A.; EPHRUSSI, A.; WOOD, C. G.; LEHMANN, R.; FULLER, M. T. A. Germline-specific gap junction protein required for survival of differentiating early germ cells. **Development**, v. 129, p. 2529-2539, 2002.

ULLMANN, S. L. Oogenesis in *Tenebrio molitor*: Histological and autoradiographical observations on pupal and adult ovaries. **J. Embryol. Exp. Morph.**, v. 30, n. 1, p. 179-217, Great Britain, 1973.

VALENTE, M. M. **Estudo anátomo-histológico do aparelho genital da fêmea *Ramphobeteus sorocabae* Mello-Leitão, 1923 (Araneae-Aviculariidae)**. Botucatu, 1984. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista.

VAN LENTEREN, J. C. Fundamental knowledge about insect reproduction: essential to develop sustainable pest management. **Inv. Reprod. Develop.**, Philadelphia, v. 36, p. 1-15, 1999.

VISCUSO, R.; NARCISI, L.; SOTTILE, L.; GIUFFRIDA, A. Secretory product of the lateral oviducts of *Baculum thairi* Haus (Phasmida: Phasmatidae) and its change during egg transit. **Int. J. Insect Morphol. Embryol.**, v. 25, n. 4, p. 369-379, 1997.

YANO, Y.; MORI, T.; SHIRAISHI, S.; UCHIDA, T. A. Ultrastructural observations of oogenesis in the adult cattle tick, *Haemaphysalis longicornis*. **Adv. Inv. Reprod.**, v. 5, p. 553-558, 1990.

YEAMAN, C.; GRINDSTAFF, K. K.; NELSON, W. J. New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial polarity. **Physiological Reviews**. v. 79, p. 73-88, 1999.

YORK, W. S. Ultrastructural changes in follicle cell – oocyte associations during development and maturation of the ovarian follicle in atlantic croaker. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 92, p. 402-418, 1993.

WARBURG, M. R.; ROSENBERG, M. The reproductive system of female *Buthotus judaicus* (Scorpiones, Buthidae). **Biol. Struc. Morph.**, v.4, n. 1, p. 33-37, 1992.

WARBURG, M. R.; ELIAS, R.; ROSENBERG, M. Ovariuterus and oocyte dimensions in the female buthid scorpion, *Leiurus quinquestriatus*, H & E (Scorpiones: Buthidae) and the effect of higher temperature. **Inv. Reprod. Develop.**, v.27, p. 21-28, 1995.

WILLIAMSON, A.; LEHMANN, R. Germ cell development in *Drosophila*. **Annu. Ver. Cell Dev. Biol.**, v. 12, p. 365-391, 1996.